

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**Efectos de los tratamientos térmicos sobre
las proteínas de la leche**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR**

Oumarou DJOBO

Julio, 2014





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviedo.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR

Dra. **Marta Elena Díaz García**, Catedrática de Química Analítica de la Facultad de Química (Universidad de Oviedo),

CERTIFICA,

Que D. **Oumarou Djobo** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 7ª promoción Curso 2013-2014.

Oviedo, 16 de Julio de 2014

Dra. Marta Elena Díaz García

VºBº

Mario Díaz Fernández

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer a mi directoria de memoria, Dra Marta Elena DIAZ GARCIA, y al Dr. Alfonso Fernandez, por todo su ayuda, su apoyo y su paciencia.

A mi amigo Alejandro R. CATALINA por creer en mi y por estar siempre que lo he necesitado, por haberme dado la oportunidad de estudiar este máster. Sé que estarás siempre que te necesito cualesquiera que sean los kilómetros que nos separan y cualquier que sea la situación.

A mis amigos Awali M. BOUBAKAR y Sandrine HOUANVOEGBE, por estar siempre disponibles, por todos los momentos de humor en mis momentos de dificultades.

A D. Francisco Gomez DEL CASTILLO y Bélen Romon LABRADADOR por su apoyos moral, su consejos y orientación. Gracias por enseñarme que uno puede siempre hacer algo más para los demás.

A D. Enrique TOLÍN, de la Central Lechera Asturiana para su ayuda y por proporcionar las muestras de leches fresca y en polvo.

A mi familia por todo el amor, toda la solidaridad y por creer en mi.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	
Resumen	
Abstract	
Lista de Figuras	VIII
Lista de tablas	X
1 Introducción	1
I Teoría	4
2 Tecnología de producción de leche en polvo	5
2.1. Interés de las leches en polvo	5
2.1.1. Larga duración, conservación y manejo fáciles del producto	5
2.1.2. Regulación de la estacionalidad	6
2.1.3. Abaratamiento del transporte	6
2.1.4. Gestión económico-social de la política agro-alimentaria	6
2.2. Fundamentos de elaboración de leches concentradas y en polvo	6
2.2.1. Pretratamientos previos	7
2.2.2. La concentración	8
2.2.3. El secado de la leche	12
3 Espectroscopia de dicroísmo circular	17
3.1. Fundamentos	18
3.1.1. Radiación electromagnética	18
3.1.2. Polarización de la radiación	18
3.1.3. El dicroísmo circular	20
3.1.4. Quiralidad y CD	24
3.2. Estructura y espectro de CD de las proteínas	24
3.3. Dicroísmo circular de las proteínas	26
3.3.1. Absorción de las proteínas en la región ultravioleta	26
3.3.2. Espectro de dicroísmo circular de las proteínas	26
4 Espectroscopia infrarroja con la transformada de Fourier	30
4.1. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier	30

II Consideraciones experimentales	35
5 Materiales y métodos	36
5.1. Materiales	36
5.1.1. Muestras	36
5.1.2. Muestras de referencia	36
5.1.3. Materiales	36
5.2. Métodos	37
5.2.1. Preparación de las muestras	37
5.2.2. Procedimientos	37
6 Resultados y discusión	40
6.1. Resultados	40
6.1.1. Proceso de conversión en polvo	40
6.1.2. Proceso de desnatado/semidesnatado	43
6.1.3. Estabilidad térmica de las proteínas de la leche	44
6.2. Discusión	46
6.3. Conclusiones	47
Bibliografía	49
Appendices	52
A Los aminoácidos naturales	53
B Otras estructura secundarias de la proteínas	54
B.1. Hélice-giro-hélice	54
B.2. Coiled-coil	54
B.3. Horquilla β	56
B.4. Motivo $\beta - \alpha - \beta$	56
B.5. Meandro β	56
B.6. La hélice β	56

Resumen

En este trabajo, se ha estudiado los efectos de los tratamientos térmicos sobre las proteínas de la leche, por una parte debido a los procesos de su transformación en polvo, y por otra parte, sobre leches semidesnatada y desnatada. Se utilizaron para ello, muestras de leche fresca y su derivado en polvo, procedente de la Central Lechera Asturiana, y muestras de leche semi - desnatada y desnatada ambas comerciales. Los estudios se realizaron mediante espectroscopia de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano, y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier, en el mediano infrarrojo. Se prepararon diluciones de leche para todas las muestras a la misma concentración.

Por una parte, se determinaron los espectros de dicroísmo circular la leche fresca como referencia, y luego se comparo con el espectros de la leche en polvo reconstituida según las recomendaciones de la Central Lechera. Se determinaron también los espectros de espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier de las misma muestras. En ambos casos, los resultados obtenidos son un deterioro de estructura secundaria de las proteínas.

Por otra parte, se determinaron los espectros de dicroísmo circular de las leches semi-desnatada y desnatada, variando la temperatura de un intervalo de 10 °C, desde la temperatura ambiente (considerada aquí como 26 °C), hasta 86 °C. Los resultados obtenidos demostraron que las proteínas de la leche desnatada son más sensibles al calor que las proteínas de la leche semi-desnatada.

Abstract

In this work, we studied the effects of heat treatment on milk proteins, on the one hand due to the processes of powder processing, and on the other hand, on semi-skimmed and skimmed milk. For this purpose, fresh milk and its powder derivative from Central Lechera Asturiana, and skimmed and semi- skimmed milk, both trade milk, samples were used.

The studies were performed by circular dichroism spectroscopy in the far ultraviolet and Fourier transform infrared spectroscopy in the medium infrared. Dilutions of milk were prepared for all samples at the same concentration.

First, the circular dichroism spectra of fresh milk were determined as reference, and then compared to the spectra of powdered milk reconstituted as recommended by the Central Lechera. Fourier transform infrared spectroscopy spectra of the same samples were also determined. In both cases, the results are a deterioration of secondary structure of proteins.

Furthermore, the circular dichroism spectra of the semi-skimmed milk and skimmed milk were determined by varying the temperature by interval of 10 °C, from ambient temperature (taken here as 26 ° C) to 86 ° C. The results showed that the proteins in the skimmed milk are more sensitive to heat than the proteins of the semi-skimmed milk.

LISTA DE FIGURAS

2.1. Etapas de producción de leche en polvo	9
2.2. Esquema de una etapa de un evaporador de flujo descendente	10
2.3. Principio de funcionamiento de una planta de filtración	12
2.4. Funcionamiento del secador de rodillos	14
2.5. Fundamento de secado por atomización	14
3.1. Representación de una onda electromagnética	18
3.2. Símil mostrando la polarización de una onda	19
3.3. Polarización de la luz	19
3.4. Polarización lineal de la luz	20
3.5. Componentes polarizados circularmente	21
3.6. Polarización elíptica de la luz	21
3.7. Interacción de las componentes polarizadas con la materia	22
3.8. Esquema de los componentes de un haz de luz plano-polarizado. (A) Se representan los vectores de los componentes del haz antes de llegar a la muestra. (B) Esos mismos vectores después de interactuar con los solutos de la muestra, fuera de fase. (C) Los mismos vectores cuando son absorbidos en diferente proporción. λ_i = longitud de onda; ϵ_i = coeficiente de extinción molar.	22
3.9. Elipticidad y rotación óptica	23
3.10. Espectros de DC en el UV lejano de las principales conformaciones y grupos de las proteínas	25
3.11. Helice alpha	27
3.12. Estructura de la lámina β paralela. (a) Disposición de las hebras. (b) Vista lateral. (c) Conexión entre las hebras de una misma cadena.	28
3.13. Estructura de la lámina β antiparalela. (a) Disposición de las hebras. (b) Vista lateral. (c) Conexión entre las hebras de una misma cadena.	28
4.1. Esquema básico de los componentes de un espectrofotómetro FTIR	32
4.2. Transformación del interferograma en espectro	34
6.1. Espectro de CD de la leche fresca y en polvo	40
6.2. Espectro de FTIR de la leche fresca y en polvo	42
6.3. Espectros de CD de leches semidesnatada y desnatadas comerciales a temperatura ambiente	43
6.4. Espectros de CD de las proteínas de la leche semidesnatada a distintas temperaturas	44

6.5. Espectros de CD de las proteínas de leche desnatada a distintas temperaturas . .	45
6.6. Variación de la señal de CD en función de la temperatura	46
B.1. Hélice-giro-hélice	54
B.2. Coiled coil	55
B.3. Cremallera de leucina	55
B.4. Horquilla β	56
B.5. Estructuras supersecundarias	57

LISTA DE TABLAS

2.1. Especificaciones ADMI para leche en polvo desnatada.	7
2.2. Especificaciones del Codex Alimentario para leche en polvo entera	8
4.1. Frecuencias de vibración IR características de distintos grupos funcionales . . .	31
5.1. Características de los espectrómetros utilizados	36
6.1. Características de las bandas del enlace peptídico	42

INTRODUCCIÓN

El consumo de la leche en la alimentación humana data de miles de años atrás. Desde entonces, a medida que evolucionó y con el desarrollo de la tecnología, se ha ido dedicando una particular atención en tanto a la calidad de los alimentos de consumo humano, tanto como a su preservación. Dado que la leche es uno de los alimentos naturales más completos, se han buscado desde siempre muchos y diversos medios de mejora y conservación para este alimento que de origen se presentaba exclusivamente en su forma líquida. Con estos propósitos, y con los avances tecnológicos y científicos, la leche se ha visto transformada en varios productos derivados, de entre los que uno de los más importante es la leche en polvo. La primera producción data desde hace dos siglos y ha experimentado un aumento importante a nivel industrial, resultando de un gran interés comercial dadas las ventajas que ofrece frente a los demás productos derivados de la leche. Sin embargo, el objetivo de preservación no es el único buscado, si bien que también es importante la calidad del producto. Esta calidad depende de sus componentes, que determinan su poder nutricional y funcional tal como su aporte en la homeostasis y su capacidad de preservar la salud humana. Las proteínas son uno de los componentes altamente importante buscado en la leche y sus derivado sobre todo cuando se trata de alimentación infantil. Las funciones de las proteínas en organismo humano son muy variados y muy importante para su funcionamiento y su mantenimiento. Sin entrar en detalles y con propósito de ejemplo, a las proteínas se les reconocen las siguientes funciones:

- función estructural
- función enzimática
- función hormonal
- función reguladora
- función homeostática
- función defensiva
- función de transporte
- función de reserva

Durante el procesado de la leche para su transformación en leche en polvo, está sufre una serie de tratamientos que pueden resultar dañinos para las proteínas. Del mismo modo, la leche sufre una serie de tratamientos previos, que incluyen tratamientos térmicos, antes del procesamiento propiamente dicho, ya sea para su conservación o higienización. Con el propósito de conservar lo más fielmente posible las propiedades físicas, estructurales y organolépticas de la leche original, se han estudiado los efectos de los procesos industriales sobre

la calidad de la misma. Uno de los tratamientos más frecuentes en la industria alimenticia aplicado a la leche son los tratamientos térmicos. De hecho, los estudios de los efectos que tienen sobre los componentes de leche, se han realizado principalmente sobre las proteínas. Las proteínas son compuestos termolabiles. Una de las clasificaciones agrupan las proteínas lácteas en proteínas solubles e insolubles. Las alteraciones difieren según los tipos de proteínas, sean éstas solubles o caseínas. Sin embargo, de todos los estudios realizado hasta ahora , no se conocen pruebas de desnaturalización de las proteínas solubles aun que se ha demostrado que a medida que se va aumentando la temperatura de tratamiento, el porcentaje de proteínas solubles desnaturalizado también aumenta [1]. Actualmente, resulta muy difícil encontrar biografía que trate de las alteraciones estructurales de las proteínas debidos específicamente al proceso de su transformación en polvo. Los efectos debidos a los tratamientos previos, sin ninguno otro tratamiento especial, vienen añadirse a los debidos al proceso de secado propiamente dicho. Incluso los tratamientos térmicos suaves inducen el inicio de las reacciones de Maillard, formando compuestos que reducen la cantidad de lisina disponibles. Las proteínas lácteas son muy ricas en lisina y de hecho, los productos lácteos que se utilicen para equilibrar “dietas” por ejemplo deficientes en lisina resultan ineficientes [2].

Objetivos del estudio

En este trabajo, se espera establecer los efectos de los diversos tratamientos térmicos sobre las proteínas. El estudio de la estructura tridimensional de las bio-moléculas proporciona información muy importante sobre sus capacidades funcionales y/o nutricionales. Hoy en días se dispone de herramientas poderosas de análisis estructural que cubre un rango amplio de dominios. Debe hacerse un énfasis especial en los métodos óptico-espectroscópicos que son los que hemos empleado en este estudio.

Objetivo general

En este estudio, el objetivo principal es de estudiar como los tratamientos térmicos afectan a las proteínas de la leche. Por una parte, estudiaremos el efecto de los tratamientos térmicos sobre las proteínas durante la fabricación de la leche en polvo, y por otra parte, los mismos efectos sobre leches frescas (desnatada y semi-desnatada) sometidas a distintas temperaturas.

Objetivos específicos

Los objetivos específicos en este trabajo son:

- Describir brevemente los métodos industriales de fabricación de la leche en polvo a fin de conocer los distintos tratamiento que pueden afectar a las proteínas,

- Describir los fundamentos de espectroscopia haciendo hincapié a los métodos de espectroscopia de dicroísmo circular y de infrarrojo con la transformada de Fourier,
- Evaluar cómo el proceso de obtención de leche en polvo afecta a las proteínas lácteas, comparándola con leche líquida,
- Estudio empleando Dicroísmo Circular: cambios en la conformación de proteínas,
- Estudio empleando FTIR: cambios en grupos funcionales,
- Estudio empleando Dicroísmo Circular: estabilidad térmica de las proteínas en presencia y en ausencia de materia grasa.

Parte I

Teoria

TECNOLOGÍA DE PRODUCCION DE LECHE EN POLVO

Introduction

Desde la antigüedad, el ser humano ha buscado métodos que le permitieran conservar los alimentos, para así disponer de ellos en épocas de escasez o para poder transportarlos durante sus desplazamientos. Como uno de los alimentos más valiosos a disposición del hombre, la leche no es una excepción a este intento. Así, la elaboración de derivados lácteos ya es conocida desde antiguo, y supusieron el primer intento de conservación de esta fuente de gran valor alimenticio. Desde la irrupción de la era industrial y la aparición de las máquinas modernas, se desarrollaron técnicas que permiten actualmente conservar la leche y sus componentes, unidos o por separado, durante largo tiempo. En estos tipos de técnicas de conservación se destacan la concentración y/o el secado de la leche. Estas técnicas se fundamentan en la deshidratación, parcial (concentración) o total (secado) de la leche. Los productos así obtenidos, concentrados o en polvo, presentan toda una serie de ventajas particulares respecto a otros sistemas de conservación. La producción de un producto seco a partir de un producto líquido requiere la eliminación de prácticamente toda el agua que contiene este último. Fundamentalmente, la producción de leche en polvo consiste en las diversas operaciones que al final conducen a la eliminación según el grado deseado del agua de una leche líquida. Existen varios métodos para eliminar el agua de la leche, aunque ninguno de ellos es óptimo [3]. No obstante, en la industria alimenticia y láctea los métodos de deshidratación más comúnmente empleados son la evaporación y el secado.

2.1. Interés de las leches en polvo

La leche en polvo (y las leches concentradas) son productos lácteos obtenidos por deshidratación de la leche líquida. La deshidratación es también una buena técnica de conservación de muchos productos alimentarios, caracterizada por alargar la vida útil de los productos. Estos derivados lácteos presentan muchas características que les hacen acreedoras de un gran interés dentro de la industria alimentaria. A continuación se presentan las principales de estas características.

2.1.1. Larga duración, conservación y manejo fáciles del producto

Los productos deshidratados, en general, tiene una duración excepcionalmente larga. Son fáciles de almacenar a temperatura ambiente y sin grandes requerimientos particulares. De

hecho, son productos ideales para disponer de leche en zonas aisladas, ó carentes de producción lechera como los trópicos, las zonas frías ó muchas islas. También, al disponer de estos productos de larga duración, los beneficios de las industrias aumentan, lo que implica que constituyen un buen negocio a escala industrial. Otra ventaja de los productos en polvo es que a menudo puede diseñarse sistemas específicos para un tipo de producto dado, por ejemplo leche entera o desnatada.

2.1.2. Regulación de la estacionalidad

Es difícil disponer de leche en cantidad suficiente a lo largo de un año ya que la producción por las vacas depende de la temporada. Por ejemplo, durante la primavera y principios del verano, el ganado produce más leche que durante el de invierno. Esto tendría un efecto negativo sobre las industrias porque para una demanda mas o menos constante, tendrían una oferta de materias primas muy fluctuante. La leche en polvo, da la posibilidad de procesar excedentes, de tal forma que no sea necesario venderlos a terceros, ante la imposibilidad de envasarlos como productos de consumo líquidos.

2.1.3. Abaratamiento del transporte

Al deshidratar, se reduce enormemente la cantidad de producto a almacenar y a transportar. De hecho, vuelven mas baratos.

2.1.4. Gestión económico-social de la política agro-alimentaria

El manejo de este tipo de productos, permite a gobiernos de grandes zonas de producción lechera, como la UE (Unión Europea), gestionar los excedentes lácteos mediante compra y venta subvencionadas (a través de organismos estatales como el FEGA, Fondo Español de Garantía Agraria, en España), facilitando así el desarrollo de la política agraria.

2.2. Fundamentos de elaboración de leches concentradas y en polvo

Para poder proceder al secado de un producto lácteo, se parte de un concentrado del mismo con objetivo de facilitar el secado. Cuanto se reduce la cantidad de agua a extraer, más tiempo y energía se ahorra. El secado así realizado puede hacerse a temperaturas más bajas y en un tiempo menor, que si hubiera que extraer la totalidad del agua del producto en su estado natural. El hecho de que la condensación y el secado de la leche vayan juntos en el proceso de elaboración de la leche en polvo hace que estas dos categorías de derivados lácteos se denominen a veces *leches conservadas*, y en referencia a las propiedades de larga conservación que tienen en común.

2.2.1. Pretratamientos previos

Antes de la elaboración de cualquier producto industrial derivado de la leche, esta debe cumplir ciertas condiciones de calidad. Existen varios parámetros considerados indicadores de la calidad de la leche como son por ejemplo el valor nutricional, la naturaleza físico-química, el contenido total y la composición en gérmenes (patógenos o no), la presencia de sustancias perjudiciales, las características organolépticas entre otros. Sin embargo, el concepto de *calidad de la leche cruda* se refiere por lo general únicamente a los aspectos higiénicos [4]. En la tabla 2.1, se presentan algunas especificaciones ADMI¹ para leches destinadas a la fabricación de leche desnatados en polvo. De esta manera, la leche en polvo que se a obtener también deber cumplir ciertas normas. En la tabla 2.2, se presentan algunas especificaciones del Codex Alimentario² para leches destinadas a la fabricación de leche desnatados en polvo.

Con respecto a los criterios de calidad mencionados, después de la *selección* de la leche, se procede a *supurificación*. Esta operación tiene como objetivo disminuir la cantidad de microorganismos dañinos presentes en la leche. Se realiza mediante una o varias centrifugaciones (también llamado *bactofugación*), o mediante filtros depuradores. Una vez realizada, se procede a la *tipificación* de la materia grasa para comprobar su cumplimiento con los requisitos de la normativa. A menudo se repite la tipificación después de la concentración. La última etapa de pretratamiento es la *esterilización* para destruir a los gérmenes termolábiles y gelatinización ulterior (acción sobre la viscosidad). Dependiendo de la temperatura de esterilización, esta etapa tiene varios efectos sobre todo sobre las proteínas de la leche. Cuando la temperatura es superior a 75 °C, aumenta la viscosidad por coagulación de la proteínas del suero. Además con temperaturas superiores a 100 °C, la caseína también tiende a coagularse dependiendo el porcentaje de coagulación de la duración del proceso [4]. Por esta razón, es común añadir estabilizantes de proteínas como por ejemplo fosfatos.

Tabla 2.1: Especificaciones ADMI para leche en polvo desnatada.

Propiedades	Atomizada	Secada (en rodillos)
Grasa	1.25 %	1.25 %
Humedad	4.00 %	4.00 %
Acidez titulable	0.15 %	0.15 %
Índice de solubilidad	1.25 mL	15 mL
Bacterias/gramo	50000	50000
Partículas quemadas	Disco B(15.0 mg)	Disco C(22.5 mg)

¹American Dry Milk Inc.

²<http://www.codexalimentarius.org>

Tabla 2.2: Especificaciones del Codex Alimentario para leche en polvo entera

Grasa	Mínimo 26 % y menos del 42 % m/m
Máxima cantidad de agua	5 % m/m
Mínima cantidad proteína en sólidos no grasos	34 %

2.2.2. La concentración

Entendemos por concentrar la sustracción de al menos el 70% del contenido en agua de la leche [4]. La evaporación es el método clásico de concentración de la leche en la industria alimentaria [5]. Se trata aquí entonces de una *deshidratación parcial* de la leche, que se puede llevar a cabo mediante calor (evaporación) y mediante membranas filtrantes microporosas a baja presión. Cualquier técnica de concentración no debe afectar a la calidad del producto, ni requerir un consumo energético o de agua elevado, debiendo ser asimismo controlable con precisión. En la Figura 2.1 se presenta un diagrama tecnológico muy general de fabricación de leche en polvo.

Entre estas etapas previas, la esterilización previa juega un papel importante en la viscosidad de la futura leche concentrada (sección 2.2.1). La utilización de temperaturas de 135 - 140 °C durante 3 a 4 segundos, provoca la desnaturalización de las proteínas del suero lácteo, que actúan de espesantes naturales una vez el producto ha sido concentrado y envasado.

Concentración por evaporación

En las industrias se utilizan básicamente los evaporadores de flujo descendente y los evaporador de placas.

El *evaporador de flujo descendente* opera en continuo y consiste en hacer descender una película de producto la más fina posible, a lo largo de la parte interior de un conjunto de tubos verticales, llamado *haz*. El lado exterior de los tubos se calienta con vapor, de tal modo que la leche va perdiendo agua por evaporación y concentrándose por lo tanto, mientras desciende a lo largo de los tubos. A fin de evitar el deterioro del producto, los sistemas de evaporación por flujo descendente, operan a vacío moderado, de tal modo que la temperatura de ebullición se alcanza a unos 70 - 75 °C en la primera etapa del proceso. Este vacío se realiza mediante una bomba de vacío que aspira los productos no condensables del proceso. Este tipo de evaporador puede operar en varias etapas (varios grupos de haces), lo que facilita la evaporación progresiva y suave del producto, y el aprovechamiento energético de los vapores desprendidos de la leche (vayos) de un haz determinado para calentar el siguiente. La circulación de todos estos vahos por el interior de la instalación viene promovida por el vacío que se mantiene a lo a lo largo de todas las etapas. En la Figura 2.2 se muestra un esquema de una etapa de un evaporador de flujo descendente.

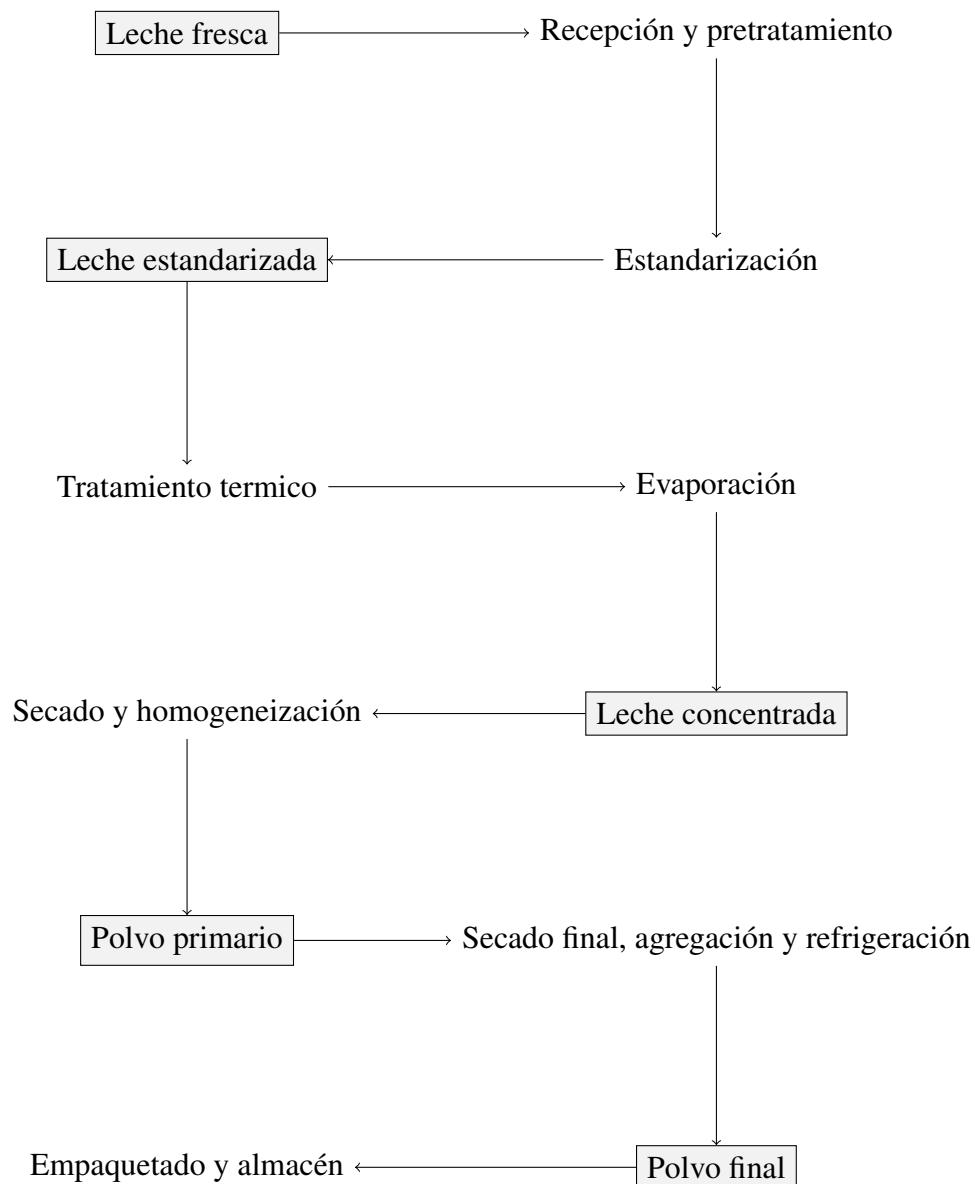


Figura 2.1: Etapas de producción de leche en polvo

En la parte inferior de los tubos del haz, el producto concentrado se transmite al siguiente efecto mediante bombas y repite la evaporación. Por otra parte, los vapores desprendidos por la evaporación del agua arrastran consigo parte de la leche por lo que es importante separarlos después mediante separadores centrífugos. La mezcla vahos-producto en estos separadores, se expande con un movimiento giratorio tangencial lo hace que el producto precipite al fondo del separador y se recircule al fondo del haz, para mezclarse con el resto del concentrado. Los vapores “limpios” salen por la parte superior del separador y se aprovechan para evaporar el producto en el siguiente efecto. Si hay más efectos, este proceso se repite y así se mantiene la circulación térmica a lo largo de todas las etapas del evaporador, gracias a la bomba de vacío que aspira los “no condensables” a la salida del condensador situado al final del último haz/separador centrífugo. Al colocar la bomba de vacío al final de la última etapa del proceso

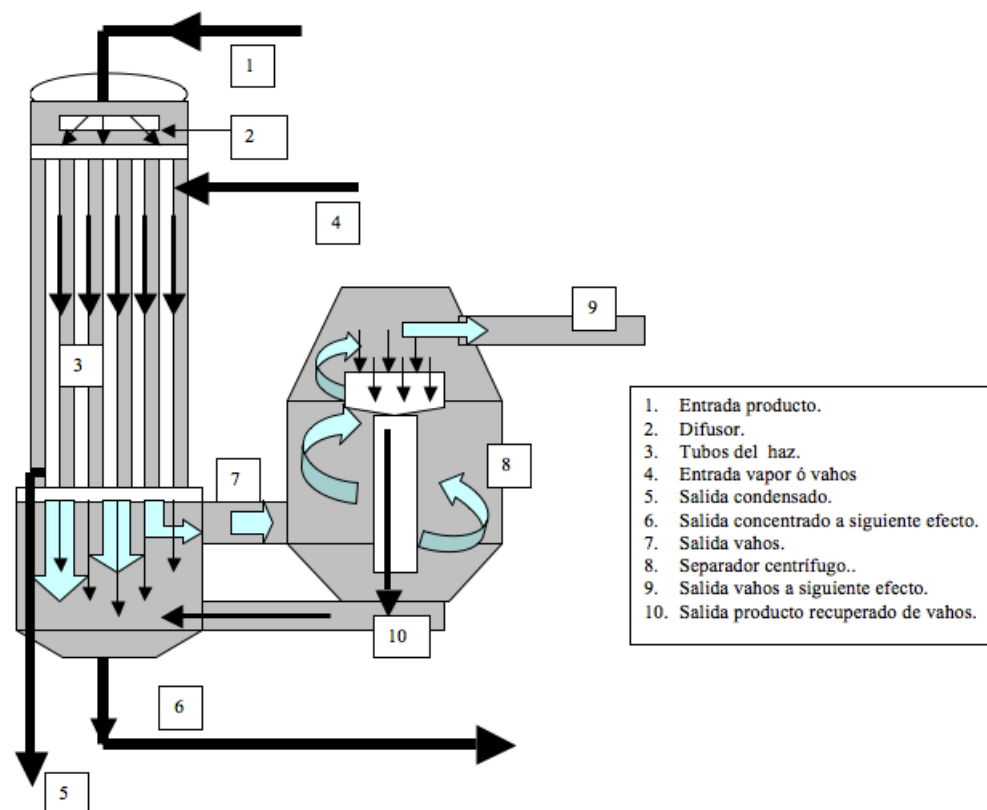


Figura 2.2: Esquema de una etapa de un evaporador de flujo descendente ^a

^aFuente: Enrique Alvarez Tolín, LECHES CONCENTRADAS Y LECHES EN POLVO, Departamento de productos industriales. Galeastur. Corporación Alimentaria Peñasanta (CAPSA)

de concentración, cada etapa sufre un vacío más intenso al que la precede (gradiente de vacío) y por consiguiente, la temperatura del producto va descendiendo a medida que se evolua hacia la etapa final. Por ejemplo, si la temperatura para la primera etapa, es de 70 - 72 °C, la temperatura del último haz para una instalación de 4-5 etapas podría ser 45 - 48 °C ³. Este método tiene la ventaja de conseguir que la temperatura de tratamiento térmico baje progresivamente mientras el producto se va concentrando. En el caso de que se requiere una concentración dada del producto, puede ajustarse el caudal de entrada o la alimentación de vapor. No obstante, el ajuste de caudal suele preferirse en las industrias lácteas.

En los *concentradores de flujo descendente en etapas*, una batería de recalentadores aumenta gradualmente la temperatura de la leche fría de la alimentación, hasta unos 80 °C. La leche pasa a un pasteurizador, donde la temperatura sube hasta 90 °C, y de allí pasa al primer haz del concentrador. En este método, la pasteurización permite la eliminación de eventuales patógenos y el ajuste de la flora banal a los límites requeridos, sobre todo cuando el producto es convertido en polvo, ya que a continuación no hay tratamiento térmico fuerte.

³Fuente: Enrique Alvarez Tolín, LECHES CONCENTRADAS Y LECHES EN POLVO, Departamento de productos industriales. Galeastur. Corporación Alimentaria Peñasanta (CAPSA)

Concentración por membranas

El agua del producto se elimina mediante una filtración del producto bajo presión, a través de membranas semi-permeables es decir que dejan pasar sólo al agua. En esto proceso se obtienen dos fracciones líquidas del producto, la fracción concentrada llamado *concentrado* o *retenido*, y otra la fracción que atraviesa la membrana llamado permeado. Aquí el factor más importante es el tamaño de los poros de la membrana, pues si el tamaño es grande pueden pasar otras sustancias cómo por ejemplo los sales minerales, las proteínas de bajo peso molecular etc. Según este hecho, los procesos de filtración por membranas se clasifican de diversas maneras en las industrias:

- Ósmosis inversa (RO, *Reverse ósmosis*), en la cual la membrana es muy cerrada y deja pasar sólo al agua. El diámetro del poro varía entre 0.0001 - 0.001 micras.
- La nanofiltración (NF) en la cual la membrana es un poco más abierta que la precedente y deja pasar sales minerales. El diámetro del poro varía entre 0.001 - 0.01 micras.
- La ultrafiltración (UF) en la cual la membrana es aún más abierta y deja pasar sales y lactosa. El diámetro del poro varía entre 0.01 - 0.1 micras.
- La microfiltración (MF) en la cual la membrana es mucho más abierta y abierta deja pasar sales, macromoléculas cómo la lactosa y las proteínas. El diámetro del poro varía entre 0.1 - 100 micras.

Otro factor determinante en el proceso de filtración según la cantidad de producto que se desea tratar, es la superficie de contacto. De todos modos, fundamentalmente, la filtración por membranas consiste en alimentar la membrana de tal manera que la leche a filtrar llegue de manera tangencial y bajo presión a la superficie de la membrana. Esta forma de operar evita que las partículas que no pueden atravesar la membrana obturen los poros de la membrana.

Las membranas están disponibles en sistemas modulares formados por unidades repetidas de membranas en forma de tubo ó de disco. Así existen membranas espirales que se utilizan generalmente para los procesos de concentración por ósmosis inversa (RO), y para la nanofiltración (NF), así cómo para algunas aplicaciones de ultrafiltración (UF). Las membranas cerámicas se emplean mayoritariamente para los sistemas de microfiltración, y las membranas planas más frecuente en las instalaciones de ultrafiltración. Este tipo de membrana resulta costoso. Por último, las membranas orgánicas tubulares son muy similares a las membranas cerámicas pero se usan para instalaciones de ultrafiltración.

En general, las instalaciones de filtración por membranas consisten en módulos dispuestos en paralelo, que operan con una entrada bajo presión de producto y dos salidas, una para permeado y otra para concentrado, desde las cuales estas fracciones se evacúan mediante bombeo a sendos tanques de almacenamiento. Es evidente que cuanto más pequeños es el tamaño del poro de la membrana, mayor presión debe aplicarse. De este modo, la ósmosis inversa necesita presiones de operación más elevadas, del orden de unos 102 atmósferas (atm) ya que opera con un tamaño de poro más pequeño. Para la NF se utilizan presiones de

alrededor de 20 atm, la UF entre 0.68 y 13.6 atm y la MF solo 0.068 a 1.7 atm.

Al aumentar la presión en un proceso de filtración por membranas, se van depositando moléculas que acaban formando una capa de membrana secundaria, lo que produce que haya una presión crítica para la cual un aumento de presión no provoca un aumento de flujo. Se establece un equilibrio a esta presión entre el material que llega a la membrana secundaria por convección, y el que es arrastrado que vuelve al concentrado par mantener la presión constante. En la Figura 2.3 puede verse el principio de funcionamiento de una planta de filtración.

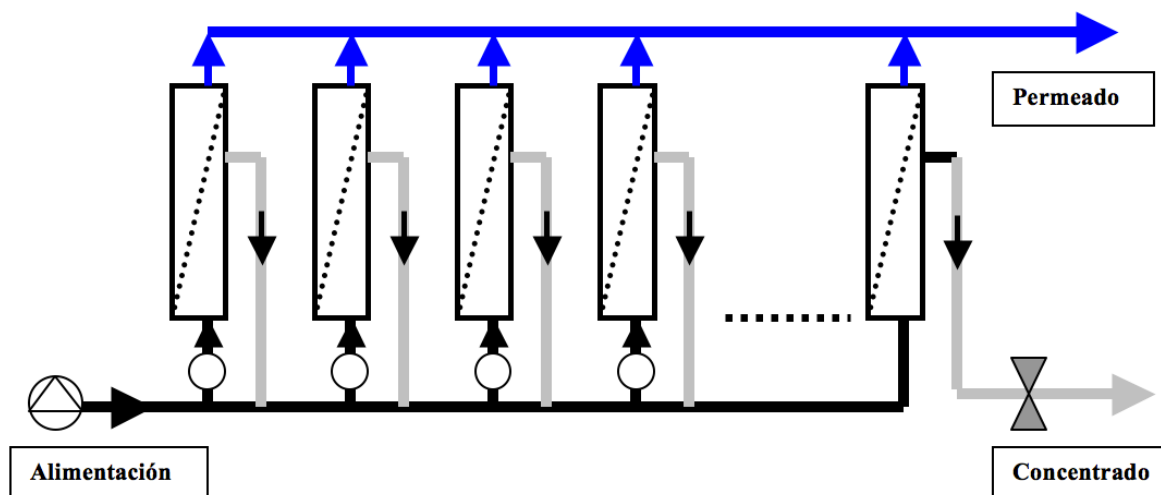


Figura 2.3: Principio de funcionamiento de una planta de filtración ^a

^aFuente: Enrique Alvarez Tolín, LECHES CONCENTRADAS Y LECHES EN POLVO, Departamento de productos industriales. Galeastur. Corporación Alimentaria Peñasanta (CAPSA)

Las técnicas de filtración, son métodos muy buenos desde de vista organolépticas y de las características físico-químicas, al no exponer la leche a altas temperaturas. Sin embargo, no permiten obtener altas concentraciones, porque la presión osmótica del concentrado aumenta a medida que evoluciona el proceso. Así por ejemplo, el caso de la RO, no es posible obtener concentrados con más del 20% de sólidos. Por encima de ese valor, la presión osmótica se eleva y puede generar problemas técnicos insuperables por ejemplo la colmatación de las membranas, lo que obliga a frecuentes limpiezas. Sin embargo, además de ser caras, las membranas se deterioran con el uso.

Cabe señalar que en la fabricación de la leche en polvo, al final del proceso de concentración, la concentración en extracto seco varía de manera general entre el 33 - 48% [6].

2.2.3. El secado de la leche

El *secado* es el proceso tecnológico durante el cual se deshidrata totalmente la leche y la transforma en leche en polvo. Existen básicamente dos sistemas de secado de la leche.

- El secado por rodillos calientes,

- El secado por torres de atomización.

Secado por rodillos

El sistema de rodillos (Figura 2.4) se utiliza en la práctica solamente para productos especiales y a pequeña escala de modo que, en general, este método no necesita una concentración previa. El secado puede realizarse en una sola etapa [7]. Por ello, en la industria láctea, el sistema más extendido y utilizado a nivel mundial, es la torre de atomización. Existen dos tipos de secadores de rodillos. En unos se alimenta la leche a secar en el canal que forma los dos rodillos y en otros se alimenta por atomización.

En la *alimentación de la leche sobre el canal de rodillos*, ambos son calentados por vapor y forman una superficie de contacto en la cual se distribuye la leche a secar. Los rodillos están dotados de un movimiento giratorio, en sentidos opuestos de tal manera que sobre cada rodillo se forma una capa delgada de leche fácil de secar. El agua se evapora en contacto con la superficie caliente de cada rodillo y el vapor se arrastra con un flujo de aire caliente. La capa delgada de leche que se forma sobre los rodillos se seca y es arrastrada mediante un sistema de cuchillos en la periferia de cada rodillo. De esta manera, se recupera la leche secada en un transportador donde se muele hasta formar *escamás* que luego sufren otra molienda hasta transformarse en polvo. Al mismo tiempo, las partículas sólidas, duras y quemadas durante el proceso se separan mediante un tamiz.

En el *secador de rodillos con alimentación por atomización*, se coloca una boquilla encima de cada tambor de manera que las boquillas atomizan la capa delgada de leche sobre los rodillos. En este sistema, al alimentar la superficie de contacto con leche atomizada, se aumenta la superficie de contacto siendo por tanto mucho más eficaz que el anterior. El resto del proceso es similar al anterior.

Torres de secado por atomización

Se inyecta a presión la leche a secar, previamente concentrada en una cámara cilíndrica calentada de acero o aluminio. El secado se realiza en una sola operación continua [3]. Se alimenta la cámara de una corriente de aire caliente (exterior a través de un filtro), y el producto a secar se inyecta a través de un dispersor, que la transforma en minúsculas gotas (atomización). Estas gotículas encuentran el aire caliente y se secan fácilmente en el seno del mismo. El agua se evaporada se arrastra por la corriente de aire, mientras el extracto seco del producto cae al fondo de la cámara de secado en forma de pequeñas partículas llamadas *finos*. Como el fino es arrastrado mediante el aire, éste pasa a través de un ciclón para la separación de los últimos finos arrastrados con lo que el producto seco cae en un sistema neumático de transporte y es evacuado hacia otras etapas del proceso. Un esquema del proceso puede verse en la Figura 2.5. Al final de este proceso, el producto no está totalmente seco sino que contiene una humedad residual, cuyo valor máximo está regulado por la legislación

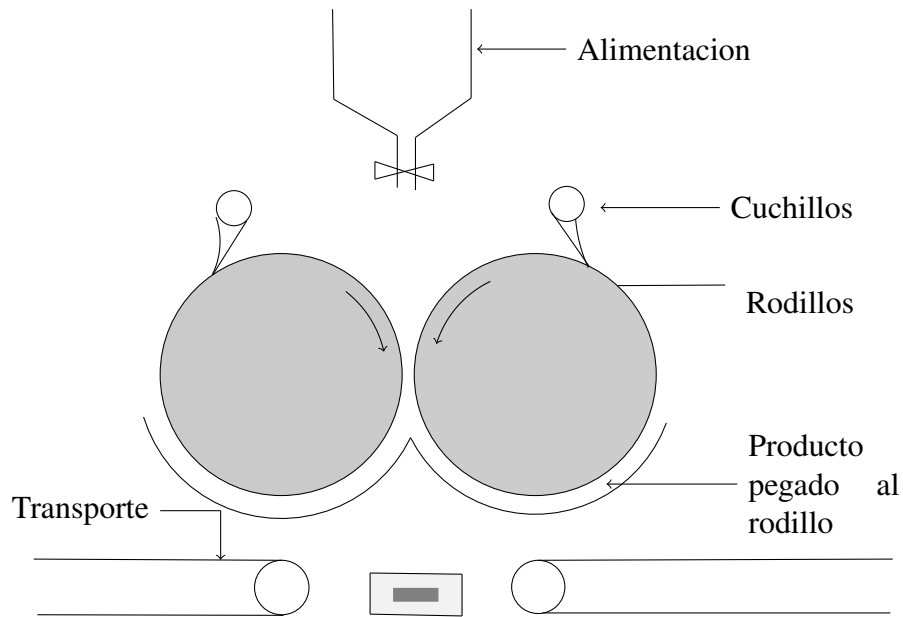


Figura 2.4: Funcionamiento del secador de rodillos

correspondiente.

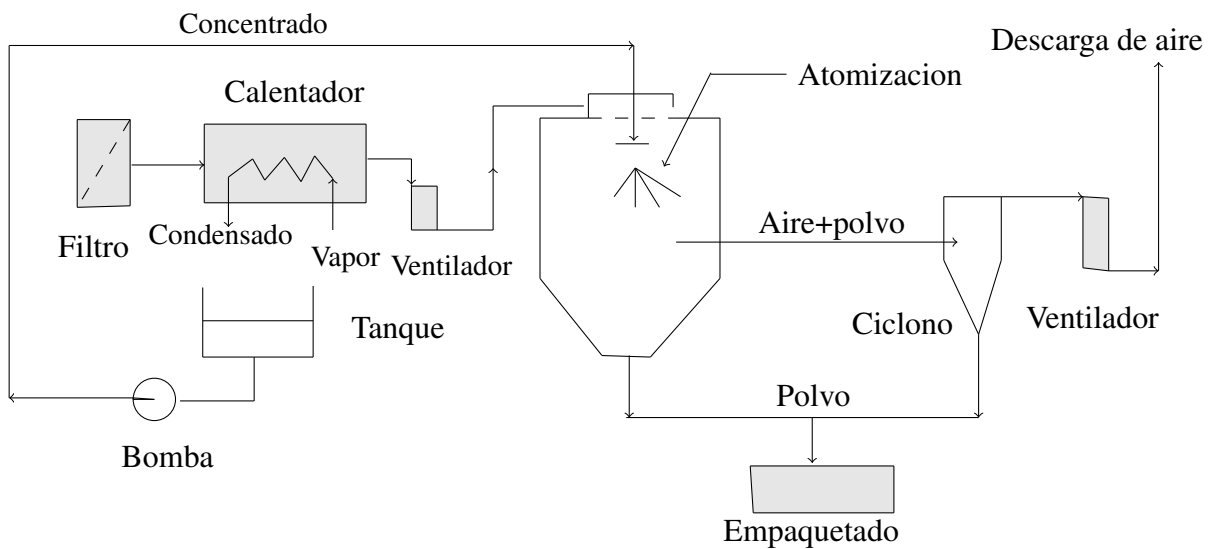


Figura 2.5: Fundamento de secado por atomización

Cabe señalar que el aire de secado se calienta mediante un intercambiador de calor y su temperatura alcanza los 200 °C a la entrada de la cámara y cae hasta unos 100 °C a la salida [8]. Según el sistema utilizado en la inyección de la leche en la cámara de secado, existen la atomización por disco y la atomización por toberas.

En la atomización por disco la leche a secar se inyecta al interior de un disco, giratorio

(200 m/s). El disco está perforado en su lado exterior, por lo que la leche se lanza a presión a través de unos conductos especiales hacia estos pequeños orificios, llegando al interior de la cámara de secado, en forma de niebla formada por microgotas. A mayor velocidad, más finas las gotas. Se emplean para grandes volúmenes de secado y para concentrados especialmente viscosos. El factor más importante aquí es la velocidad de giro, cuya regulación permite adaptarse a productos y circunstancias diversas.

En la *atomización por toberas* se emplea un conjunto de toberas (inyectores) para atomizar el producto que se inyecta mediante una bomba de alta presión. Las toberas convierten la energía de presión de la bomba de alta de presión y ministra esta última al producto a secar. Cada tobera lleva en el extremo un núcleo y un orificio y consta de dos piezas de acero especial que sirve para pulverizar el producto en forma de fina lluvia fina (orificio) y también impone a las microgotas un movimiento de giro, a fin de que adquieran en el interior de la cámara, la forma de un cono hueco (núcleo). El número total de toberas que se emplea varía de una instalación a otra pero depende de la configuración y del tamaño de la cámara de secado. La cantidad de producto pulverizada depende fundamentalmente del tamaño del orificio. Sin embargo, el ángulo del cono formado depende también de este factor pero también del estriado del núcleo. Así, existen diferentes combinaciones de orificios y núcleos, para lograr las condiciones precisas para secar cualquier producto. Las toberas favorecen la aglomeración, y la formación de partículas grandes por lo cual se usan mucho para la fabricación de leche instantánea.

Lecho fluido vibrante

Consisten en una estructura cilíndrica de acero inoxidable, en el interior de la cual hay una plancha. La leche proveniente de la cámara de secado está colgada a la plancha de tal forma que cuando salga tendrá una *humedad residual* elevada entre 6 - 8%. El lecho se está animado de un movimiento vibratorio que agita y mezcla la leche continuamente y el secado tiene lugar mediante aire caliente que se pasa a través del lecho. Como al principio la humedad es alta, las partículas se agregan formando aglomerados y al mismo tiempo se pasa aire caliente a temperatura controlada por el interior del lecho, a través de pequeños orificios practicados en la propia plancha de transporte, de tal forma que se produce una evaporación parcial del agua de los aglomerados. De esta manera se ajusta la humedad final del producto que en este caso se llama *leche en polvo instantánea*. La principal diferencia entre la leche instantánea y los productos no instantáneos es que las partículas del polvo tienen un mayor grosor. Este tipo de proceso funciona en dos etapas por lo que la temperatura de secado resulta suave y se logran partículas de tamaño relativamente grandes que se aglomeran fácilmente.

El proceso de fluido vibrante resulta particularmente interesante por que la leche instantánea se disuelve mucho más fácilmente que los otros productos en polvo no instantáneos. La *instantaneidad* es una propiedad muy apreciada por los consumidores. El grado de instantaneidad

neidad depende principalmente de la superficie de contacto partícula - agua que proporciona una humectación efectiva (capacidad de dispersión). A mayor superficie de contacto corresponde un mayor grado de instantaneidad. En las cámaras de secado y debido al calor, las partículas de leche en polvo suelen ser pequeñas y con una superficie dura y compacta en las cámaras de secado. Sin embargo, los lechos fluidos también llamados lechos “instantaneizadores” dotan a la leche en polvo de esta propiedad.

Equipos auxiliares

Son equipos que no intervienen en el proceso de secado propiamente dicho, pero que son necesario para completar la fabricación de la leche en polvo. Dentro de ellos los tanques de balance situados entre el evaporador y la torre de secado absorben las diferencias entre la cantidad de concentrado y el consumido por la torre, garantizando un flujo regular entre ambos. Los homogenizadores, como su propio nombre indica, se utilizan para homogeneizar productos ricos en grasa antes de ser secados. Los pasteurizadores permiten reducir la carga microbiana del concentrado antes y después del secado respectivamente. Los ciclones sirven para separar las últimas partículas que son arrastradas por el aire y así evitar pérdidas. Una bomba de alta presión (de pistones) permite proporcionar la presión requerida para inyectar la leche concentrada al sistema de toberas de una torre de secado (200 a 400 bar) y las baterías de aire caliente sirven para calentar el aire de secado. Utilizan un gas obtenido por combustión ó bien un vapor. Sin embargo existen otros sistemas de calentamiento cómo son los sistemas de radiadores. En el proceso, las válvulas rotatorias conectadas a distintos niveles permiten de extraer la leche en polvo por ejemplo de los ciclones y lechos, y también incorporarla a los sistemas de tuberías de transporte. Por fin, las soplantes proporcionan la corriente de aire que lleva la leche en polvo por las tuberías de un lugar al otro y las ensacadoras dispensan en sacos para su almacenaje la leche en polvo controlando el peso y las paletizadas distribuyen en paletizados.

ESPECTROSCOPIA DE DICROISMO CIRCULAR

Introducción

El dicroismo circular (CD) es una técnica de espectroscopia de absorción que proporciona información acerca de la estructura de las macromoléculas biológicas y permite estudiar compuestos quirales. En esta técnica, se mide una señal que es la diferencia entre la absorbancia (A) de la luz polarizada circularmente hacia la izquierda (A_l) y hacia la derecha (A_r). De esta manera, se puede obtener información acerca de las estructuras secundarias y terciarias de bio-macromoléculas como por ejemplo las proteínas de la leche. El CD es también una herramienta valiosa en una amplia gama de aplicaciones, como por ejemplo:

- Determinación de la pureza óptica de compuestos orgánicos u organometálicos, tanto en disolución como sólidos (en pastilla de KBr)
- Determinación de la estructura secundaria de proteínas (como ya mencionado)
- Estudios conformacionales de proteínas y péptidos
- Estudios de desnaturalización química o térmica de proteínas
- etc.

Jean Baptiste Biot y Auguste Fresnel independientemente uno del otro realizaron investigaciones sobre la actividad óptica entre 1812 y 1823 [9]. Estos científicos a menudo se consideran como los padres de la espectroscopia del dicroismo circular. La actividad óptica es la propiedad que tiene ciertas moléculas de cambiar el plano de polarización de la luz polarizada. Se exhibe en las bandas de absorción de moléculas quirales ópticamente activas. La espectroscopia de CD tiene una amplia gama de aplicaciones en muchos campos diferentes. Tiene muchas variantes con aplicaciones diversas. Así por ejemplo, el CD en la región ultravioleta (UV) se ha utilizado para investigar la estructura secundaria de las proteínas. En la región UV-visible se utiliza en la investigación de las transiciones de transferencia de carga. El CD en el infrarrojo cercano se utiliza para investigar la estructura geométrica y electrónica mediante el sondeo de metal de transiciones. Existe además una variante, el CD vibracional que se fundamenta en la utilización de la luz de la región infrarroja, se ha utilizado recientemente en la investigación de las estructuras de moléculas orgánicas pequeñas, proteínas y ácido desoxirribonucleico (DNA o ADN). El dicroismo circular es una técnica sencilla, que no requiere equipos complicados y que proporciona información estructural importante sobre las moléculas de estudio (por ejemplo proteínas o péptidos) [10]. Ésta es una de las razones por las que el CD es una de las técnicas más utilizadas a la hora de obtener información estructural de nuevos péptidos o proteínas.

3.1. Fundamentos

3.1.1. Radiación electromagnética

A fin de describir las propiedades de las radiaciones electromagnéticas, los científicos usan un modelo clásico de una onda sinusoidal cuyos parámetros son su frecuencia (ν), su longitud de onda (λ) su velocidad (v) y su amplitud (A). Sin embargo, en los fenómenos asociados con la absorción y/o emisión de la energía radiante, el modelo ondulatorio clásico falla y hay que recurrir a un modelo corpuscular, empleando la teoría de la Dualidad Onda-Corpusculo de De Broglie. El modelo corpuscular considera la radiación electromagnética como un flujo de partículas discretas o paquetes ondulatorios de energía que se llaman *fotones* [11].

Con todo lo anterior, se considera la radiación electromagnética está formada por un campo eléctrico y un campo magnético perpendiculares entre si y en fase, con oscilaciones sinusoidales de uno respecto a otro y respecto a la dirección de propagación [11] cómo se ve en la Figura 3.1.

En la Figura 3.1 puede verse los parámetros arriba mencionados de una radiación electromagnética. La frecuencia ν representa el número de oscilaciones del campo por unidad de tiempo. Es la inversa del periodo que el es el tiempo necesario para el paso de un máximo o un mínimo al siguiente. La longitud de onda λ es la distancia lineal entre dos máximo o dos mínimos sucesivos de la onda. A veces se usa el número de onda que es la inversa de la longitud de onda.

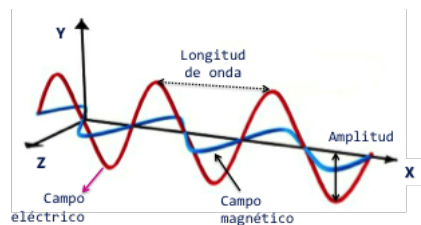


Figura 3.1: Representación de una onda electromagnética

3.1.2. Polarización de la radiación

La radiación natural consta de haces de ondas electromagnéticas en las cuales las vibraciones de los campos eléctricos y magnéticos que les componen están distribuidas en todas las direcciones a lo largo de su trayectoria. Al ser constituido por un campo eléctrico y un campo magnético perpendiculares entre si y a la dirección de propagación, la radiación electromagnética es una *onda transversal*. Cuando se consigue que la vibración de las ondas se realice en una dirección determinada, se habla de *fenómeno de polarización*. En la Figura

3.2 se muestra el símil empleando el movimiento de una cuerda a la que se hace oscilar en diferente dirección.

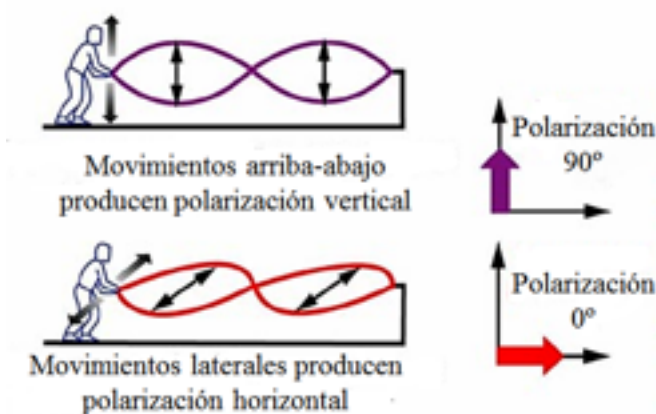


Figura 3.2: Símil mostrando la polarización de una onda

El campo eléctrico oscila en todas las direcciones normales a la dirección de propagación de la onda en la luz natural. La luz puede ser polarizada linealmente o circularmente o elípticamente. La polarización es un vector y, por ello, una onda polarizada a 30° , puede ser representada como la suma de dos ondas componentes, una polarizada horizontalmente en un 86% y otra polarizada verticalmente en un 50%, cada una de las cuales tiene una amplitud menor que la original (Figura 3.3).

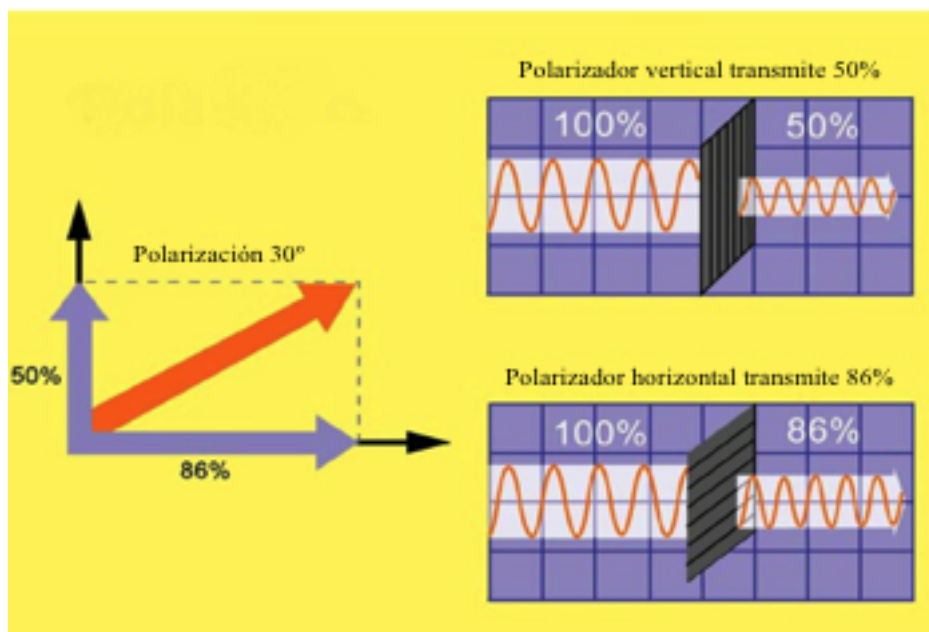


Figura 3.3: Polarización de la luz

Una onda electromagnética linealmente polarizada es plana. Pues la diferencia de fase

entre los componentes del campo eléctrico es igual a 0° . El campo eléctrico transversal de la onda va acompañado del campo magnético como en la Figura 3.4.

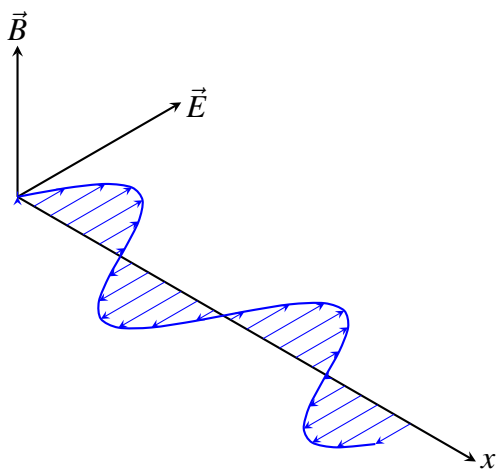


Figura 3.4: Polarización lineal de la luz

Si los componentes del campo eléctrico son de igual amplitud pero con una diferencia de fase de 90° (o 270°), entonces se dice que la luz está polarizada circularmente (Figura 3.5).

En este caso, a medida que se acerca la punta del vector del campo eléctrico, este aparece moviéndose en un círculo. Dos situaciones se pueden presentar. Si mientras se mira la fuente de luz, el vector del campo eléctrico de la luz aparece girando en sentido antihorario, se dice que la luz está polarizada circularmente hacia la derecha y si es en sentido horario, se dice que está polarizada circularmente hacia la izquierda. El vector del campo eléctrico dibuja una vuelta completa, cuando la luz avanza una longitud de onda completa. Por último, si la desfase entre los componentes del campo eléctrico es otra que las mencionadas, y de amplitudes desiguales, se dice que esta polarizada elípticamente (Figura 3.6).

3.1.3. El dicroísmo circular

Teniendo en cuenta lo anterior, la luz polarizada en un plano también se puede descomponer en dos componentes polarizados circularmente en sentidos opuestos. Ambas componentes están en fase y son de la misma amplitud (Figura 3.5). Al pasar por un medio material, cada componente de la radiación interactúa de manera diferente con los centros ópticamente activos (centros quirales, ver sección 3.1.4) de las moléculas presentes (Figura 3.7).

La diferencia en la absorción de la luz polarizada circularmente a la izquierda (LPI) y la derecha (LPD) es la base del dicroísmo circular. Una molécula que absorbe LPI y LPD de manera diferente es ópticamente activa o quiral. Como consecuencia, la luz polarizada plana se convierte en elíptica por efecto de un cromóforo ópticamente activo. Estos fenómenos provocan una rotación del plano de polarización en un ángulo θ y la distorsión de este plano genera una elipse (Figura 3.8).

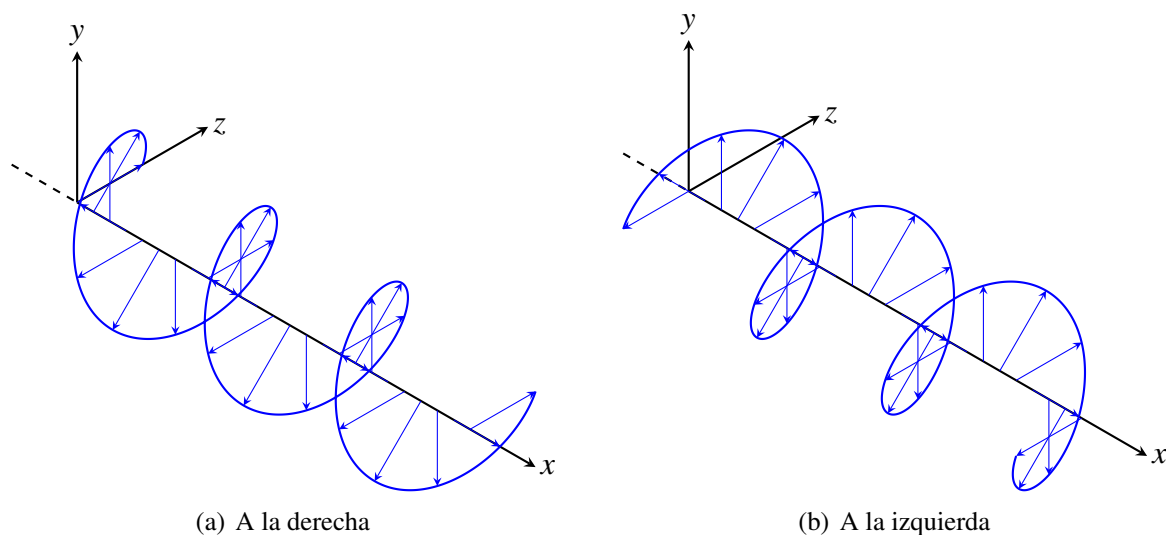


Figura 3.5: Componentes polarizados circularmente

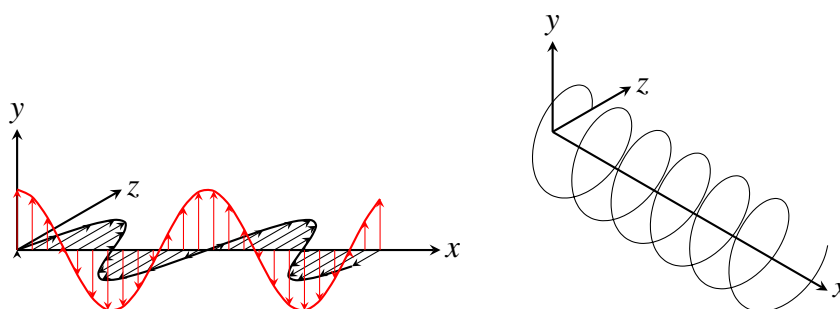


Figura 3.6: Polarización elíptica de la luz

La relación entre los ejes menor y mayor de la elipse es, por definición, la tangente del ángulo θ . El ángulo θ se llama elipticidad, mientras que el ángulo OR se llama rotación óptica (α) (Figura 3.9). La elipticidad es una consecuencia directa de la presencia de dicroísmo circular. Se puede demostrar que la elipticidad es directamente proporcional al dicroísmo circular:

$$\theta = 32.98 CD \tag{3.1}$$

La señal de dicroísmo circular viene dada por la diferencia entre la absorción de la componente circularmente polarizada a la derecha y la polarizada a la izquierda, de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\Delta A = A_{\text{izquierda}} - A_{\text{derecha}} \tag{3.2}$$

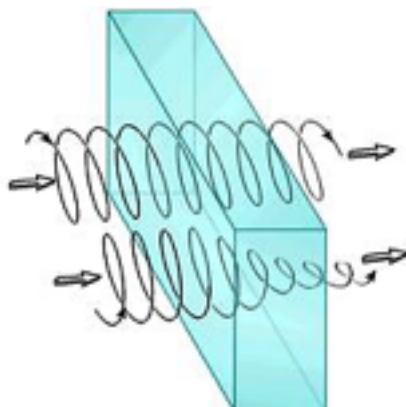


Figura 3.7: Interacción de las componentes polarizadas con la materia

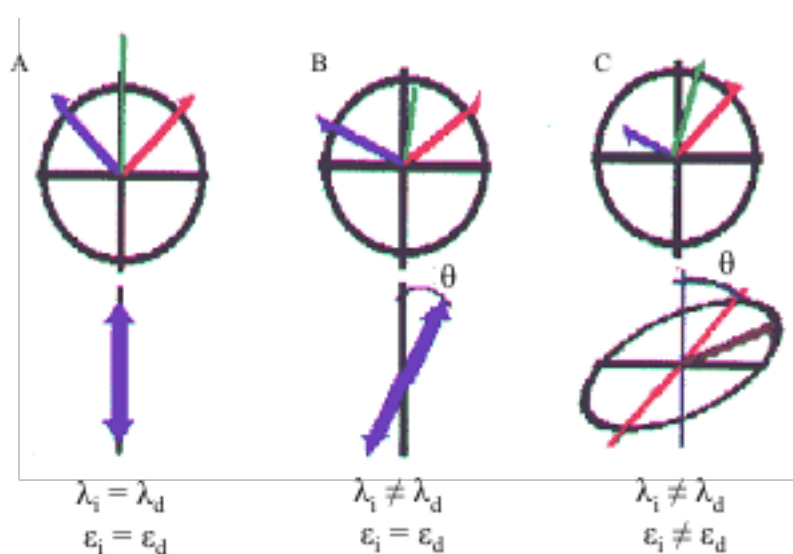


Figura 3.8: Esquema de los componentes de un haz de luz plano-polarizado. (A) Se representan los vectores de los componentes del haz antes de llegar a la muestra. (B) Esos mismos vectores después de interactuar con los solutos de la muestra, fuera de fase. (C) Los mismos vectores cuando son absorbidos en diferente proporción. λ_i = longitud de onda; ϵ_i = coeficiente de extinción molar.

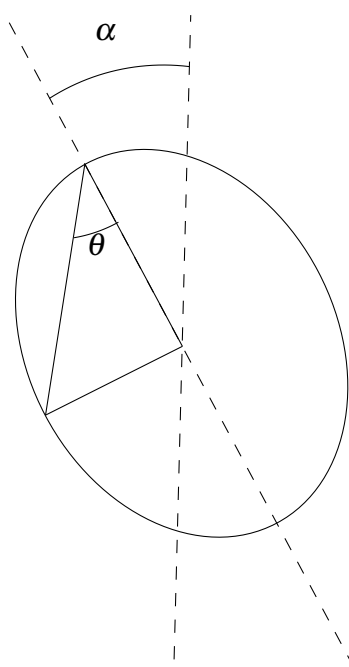


Figura 3.9: Elipticidad y rotación óptica

$$\Delta A = (\epsilon_{\text{izquierda}} - \epsilon_{\text{derecha}}) \times LC \quad (3.3)$$

$$\Delta \epsilon = \epsilon_{\text{izquierda}} - \epsilon_{\text{derecha}} \quad (3.4)$$

$$[\theta] = 3298.2 \Delta \epsilon \quad (3.5)$$

en las que

A = absorbancia a una determinada longitud de onda,

ϵ = coeficiente de absorción molar (M/cm),

L = paso óptico,

θ = elipticidad (medida en grados, deg),

θ = elipticidad molar ($deg/cm^2/dmol$).

Como los índices de refracción del medio quiral son distintos para cada componente, se produce un desfase entre ellos que provoca la rotación del plano de polarización en un ángulo α , dándose un proceso de dispersión que se conoce como **dispersión óptica rotatoria** (DOR).

Tanto DOR como DC son manifestaciones diferentes de un mismo fenómeno: interacción de la luz polarizada (I y D) con moléculas quirales. En DOR la detección consiste en evaluar el cambio de velocidad de los haces a través del cambio en el índice de refracción, ya que n

$I \neq nD$. En DC, la detección consiste en evaluar el cambio en la amplitud (I/I y D/D) de los haces a través del cambio en la absorción, ya que $\epsilon I \neq \epsilon D$.

Tanto DC como DOR varían con la longitud de onda, pudiéndose representar la rotación o elipticidad frente a la misma, obteniéndose espectros de estos fenómenos. Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250 - 350 nm) y lejano (180 - 250 nm).

En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes en proteínas son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de triptofano, tirosina, y fenilalanina. Ya que la asimetría en estos grupos químicos se debe exclusivamente a su entorno y como los residuos aromáticos se encuentran distribuidos en toda la macromolécula, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína. Además las señales en esta región son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación. En el ultravioleta lejano absorbe el enlace peptídico y el espectro de DC refleja el contenido de estructuras secundarias (Figura 3.10).

3.1.4. Quiralidad y CD

Las moléculas quirales poseen índices de refracción diferentes para la luz polarizada circularmente a la derecha (dextrógira) y a la izquierda (levógira), es decir, los haces de luz viajan a diferentes velocidades y son absorbidos en diferentes grados dependiendo de cada energía. Esto significa que los coeficientes de extinción molar para la luz circularmente polarizada dextrógira y levógira son diferentes, lo que se llama dicroísmo circular y la diferencia de absorbancia entre la luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda se grafica contra la longitud de onda para producir el espectro de CD. En efecto, al no disponer plano de reflexión, cualquier disposición electrónica de estas moléculas no tendrá plano de reflexión tampoco. De esta manera, la absorción de la luz polarizada circularmente a la izquierda y a la derecha difieren ya que en ellas el campo eléctrico describe una hélice [12].

3.2. Estructura y espectro de CD de las proteínas

La espectroscopia de dicroísmo circular se fundamenta en la geometría tridimensional de las moléculas. Probablemente, es por esta razón que se usa cada vez más para sistemas (moléculas) biológicas que cualquier otro dominio, y con un interés particularmente galopante. EL uso del CD puede llevarse a cabo mediante dos maneras distintas [12]:

1. sondear un cambio de conformación de la molécula o bien,
2. sondear la interacción de una molécula aquiral con pequeñas moléculas, lo que induce un CD.

Las proteínas son polímeros cuyos unidad elemental de construcción es el aminoácido. Existe 20 aminoácidos *naturales* que participan a la formación de las proteínas conocidas

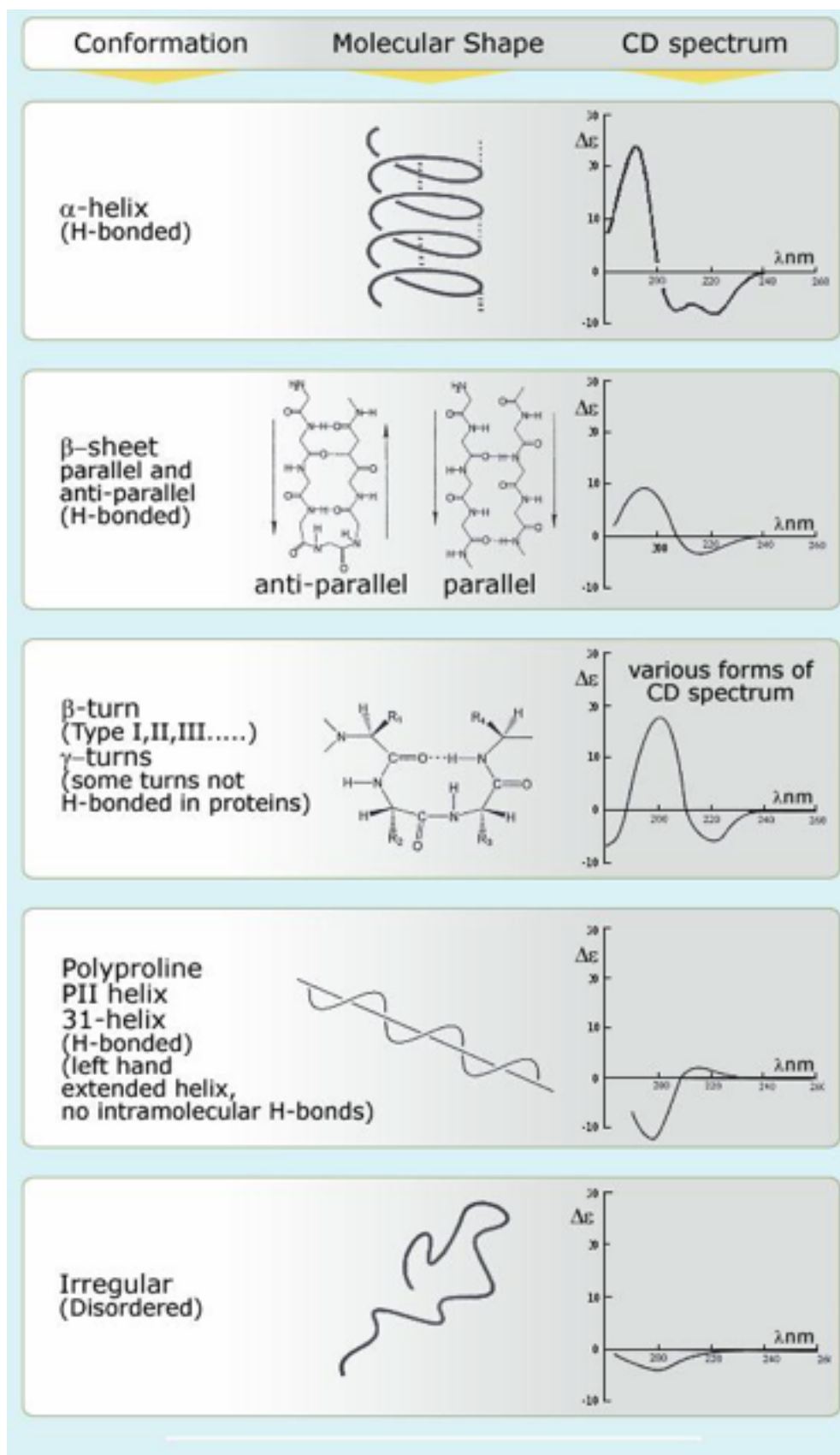


Figura 3.10: Espectros de DC en el UV lejano de las principales conformaciones y grupos de las proteínas

[13]. En el apéndice A pueden verse las estructuras de los veinte aminoácidos naturales.

La estructura primaria es la manera en la cual los aminoácidos están uno después del otro y cuales son estos aminoácidos. Las conformaciones secundarias más útiles al CD son:

- La hélice α ,
- La hoja β ,
- El giro β ,
- El motivo al azar.

3.3. Dicroísmo circular de las proteínas

3.3.1. Absorción de las proteínas en la región ultravioleta

La espectroscopia de absorción ultravioleta convencional, que se divide en UV próximo (250 - 300 nm) y UV lejano ($\lambda < 250$ nm), la absorción de las proteínas se debe a los núcleos aromáticos pero también el enlace disulfido (debido por ejemplo a la presencia de aminoácido cistina). Se considera que la absorción en el UV lejano es debido al esqueleto peptídico (formado por los consecutivos enlaces peptídicos) y una pequeña contribución de las cadenas laterales. En el UV próximo, la absorción es debida principalmente por aminoácidos con el grupo aromático (fenilalanina, tirosina, triptofano, ver anexo A).

El enlace peptídico, tiene electrones libres, los dos del oxígeno, y los del nitrógeno, que son delocalizados a través de los átomos de carbono, oxígeno, y nitrógeno. A estos electrones se añaden los electrones σ de los enlaces peptídicos. De las transiciones posibles para estos electrones, la transición $n \rightarrow \pi^*$ del grupo carbonilo corresponde a la de energía más baja, seguido por la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ con un dominio completo de la primera. De echo, la absorción debida a las cadenas es casi imposible de detectar [12]. Sin embargo, en CD, su presencia puede inducir errores.

3.3.2. Espectro de dicroísmo circular de las proteínas

Según explicado en la sección precedente, el mejor espectro de CD de las proteínas se obtiene cuando las cadenas laterales interfieren muy poco en la absorción. cómo las proteínas son formadas por motivos estructurales o asociaciones de ellos (sección 3.2), el espectro de una proteína es la suma de las contribuciones de cada uno de sus motivos constitutivos.

Espectro de la hélice α

El espectro de CD de la hélice α ha sido muy estudiado debido a su alta proporción en casi todas las proteínas. Su espectro de CD esta caracterizado por un pico negativo a 222 nm correspondiente a la transición $n \rightarrow \pi^*$ y a 208 nm correspondiente a la transición $\pi \rightarrow \pi^*$, cómo puede apreciarse en la Figura 3.10. Se ha también demostrado que la señal

del CD varia en función de la longitud de la hélice. Esta dependencia esta debido a que a cada cuatro grupos (residuos) hay un residuo libre (no implicado en un enlace de hidrogeno) y de echo el espectro de la hélice parece ser más corto de cuatro residuos de lo normal. Se entiende entonces que para un tetrapeptido el espectro de CD no vale, e incluso esta técnica en general no se usa para peptidos.

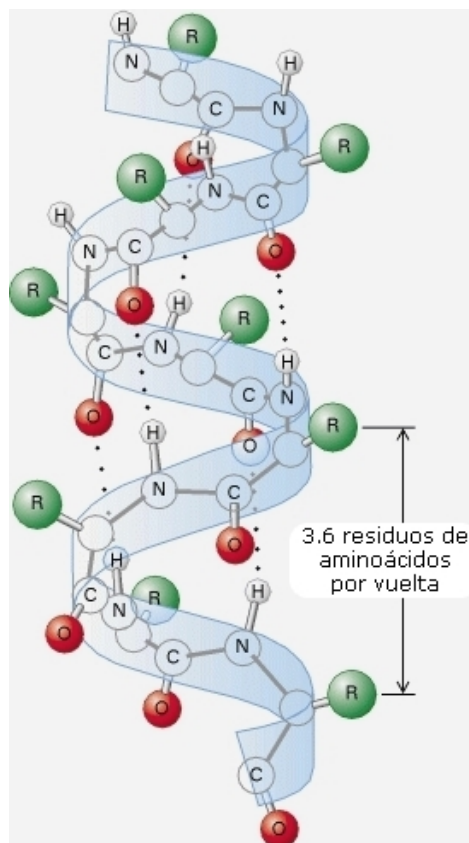


Figura 3.11: Helice alpha

Espectro de la hoja β

Las hélices α tienen una estructura más bien definida que las hojas β con una complejidad estructural (paralela, antiparalela, variación en longitud y que en espesor), menos solubles en solventes usado en espectroscopia UV y que tienden bien a tener una estructura más bien terciaria al lugar de ser plano. Esto influencia mucho su espectro de dicroísmo circular. Sin embargo, el espectro de una hoja β se caracteriza por una banda negativa alrededor de 216 nm y otra positiva alrededor de 195 nm, de magnitud más o menos igual (Figura 3.10).

Espectro del giro β

El giro β es muy característico de las proteínas globulares. Su espectro se caracteriza por una pequeña banda negativa $\pi \rightarrow \pi^*$ ligeramente desplazada al rojo alrededor de 225 nm,

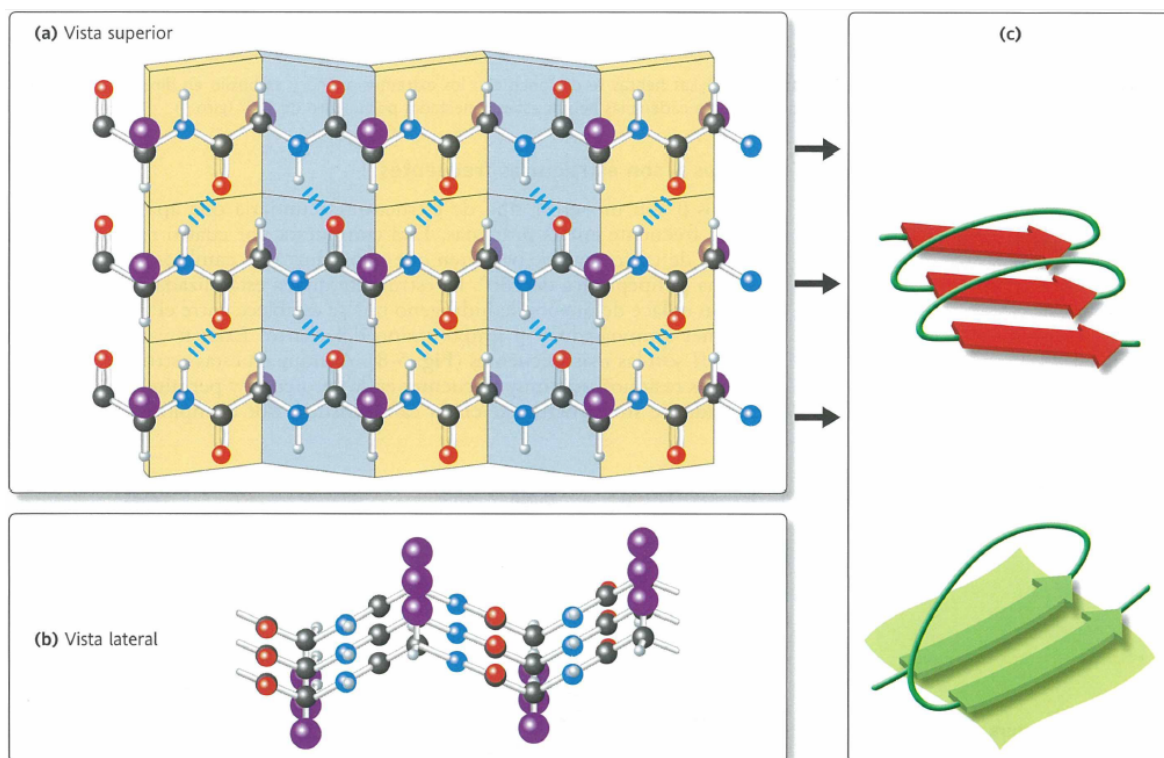


Figura 3.12: Estructura de la lámina β paralela. (a) Disposición de las hebras. (b) Vista lateral. (c) Conexión entre las hebras de una misma cadena.

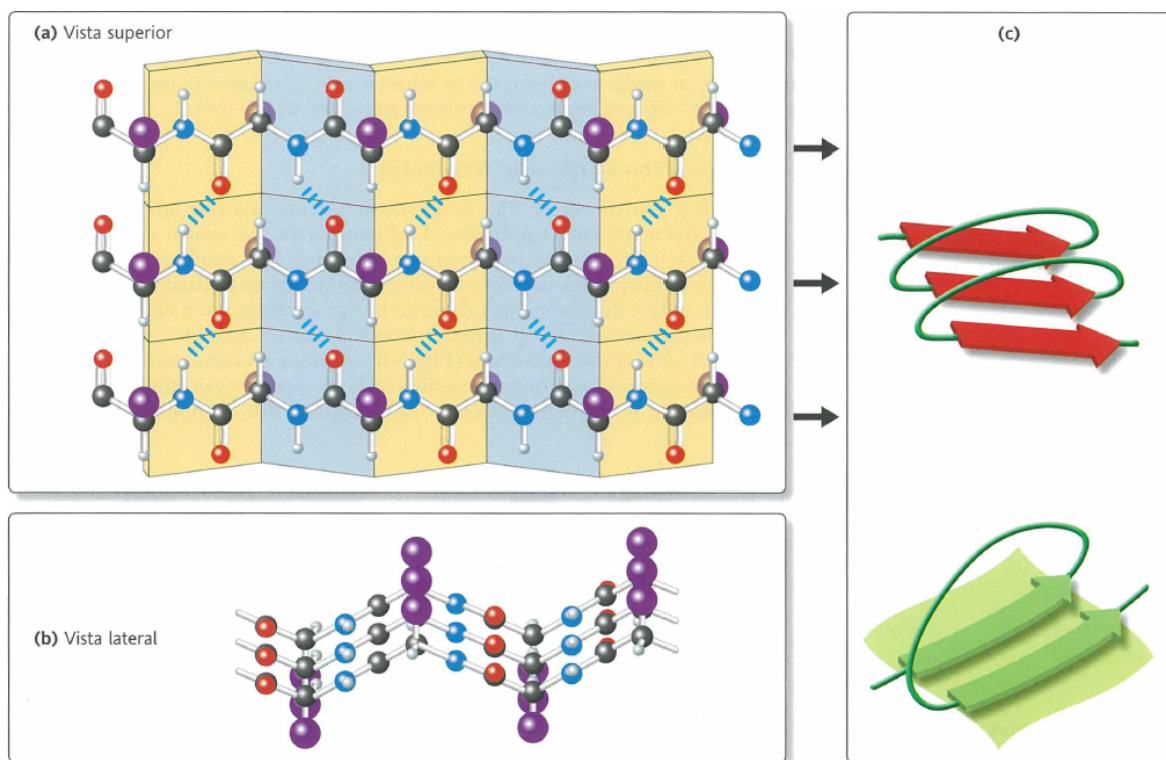


Figura 3.13: Estructura de la lámina β antiparalela. (a) Disposición de las hebras. (b) Vista lateral. (c) Conexión entre las hebras de una misma cadena.

una banda fuerte $\pi \rightarrow \pi^*$ también negativa entre 200 y 205 nm, y otra fuerte banda negativa entre 180 nm y 190 nm. Ver Figura 3.10.

Espectro de la estructura al azar

La estructura al azar es un motivo desordenada que es diferente a todos los motivos mencionados hasta aquí. Sin embargo, puede asociarse con los otros motivos que pueden ser incluidos en la misma. Esto quiere decir que una estructura al azar puede contener motivos alpha, hojas beta etc. Su espectro de dicroísmo circular se caracteriza por tener una señal alto y negativo justo debajo de 218 nm, y también una muy pequeña banda negativa a 235 nm (Figura 3.10).

Espectro de las regiones aromáticas

Los núcleos de los grupos aromáticos y los puentes disulfuros de las cadenas laterales absorben en las regiones de 300 a 250 nm y a 270 nm o inducen un dipolo magnético por lo que contribuyen en estas regiones en el espectro global de las proteínas. Incluidos más allá de 300 nm dan una señal con la cual se puede hacer una identificación. Como las cadenas laterales son separadas unas de otras, con esta señal, puede probarse un cambio de conformación en las proteínas que las contienen, y dado que no son presentes en cantidades elevadas en las proteínas.

ESPECTROSCOPIA INFRARROJA CON LA TRANSFORMADA DE FOURIER

Introducción

La espectroscopia infrarroja es una técnica muy poderosa que proporciona información cualitativa e incluso cuantitativa sobre las moléculas. Data comercialmente desde 1940 con elementos dispersivos como prismas, pero avance más importante en la espectroscopía de infrarrojos fue la incorporación de la transformada de Fourier y la sustitución de los elementos dispersivos por interferómetros. La radiación electromagnética infrarroja no tiene energía suficiente para producir transiciones electrónicas en las moléculas. Su energía es similar a las pequeñas diferencias energéticas entre los distintos estados vibracionales y rotacionales existentes en la mayoría de las moléculas. Por ello, la espectroscopía de infrarrojos proporciona información sobre los enlaces presentes en una molécula, lo que lo hace una herramienta especialmente atractiva para el análisis estructural en química orgánica e inorgánica [14]. Existen varias regiones en la región infrarroja que permiten determinar grupos funcionales en las moléculas con una gran precisión. En la Tabla 4.1, se recogen dichas regiones, junto con los grupos funcionales más característicos.

4.1. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier

Los espectrofotómetros IR dispersivos tienen varias desventajas importantes:

- Proceso de barrido lento: el proceso por pasos de adquisición de espectros es lento (5 minutos/registro)
- Pérdidas de energía: el proceso de dispersión de luz produce pérdidas de radiación y sólo una fracción llega al detector.
- Es difícil mejorar la relación señal/ruido por barridos múltiples.

La Espectroscopia de Infrarrojos con Transformada de Fourier también llamado FTIR (*Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy*), se desarrolló para solventar las limitaciones de los instrumentos dispersivos, en particular el lento proceso de barrido. La solución consistió en el empleo de un dispositivo óptico muy simple, llamado interferómetro. El interferómetro produce un tipo de señal único (interferograma) que contiene todas las frecuencias del infrarrojo codificadas. La señal se puede medir de forma muy rápida, en unos pocos segundos. Un

Tabla 4.1: Frecuencias de vibración IR características de distintos grupos funcionales

Enlace	Frecuencia de tensión	Forma e intensidad
	Zona 1: 3700-3200 cm^{-1}	
Alcohol O-H	3650 - 3200 cm^{-1}	Fuerte y ancha
Alquino $\text{C}\equiv\text{C}-\text{H}$	3340 - 3250 cm^{-1}	Fuerte y fina
Amina o amida N-H	3500 - 3300 cm^{-1}	Media, con frecuencia ancha
	Zona 2: 3200-2700 cm^{-1}	
Aril o vinil sp^2 C-H	3100 - 3000 cm^{-1}	Variable
Alquil sp^3 C-H	2960 - 2850 cm^{-1}	Variable
Aldehido C-H	2900, 2700 cm^{-1}	Medio, dos picos
Acido carboxílico O-H	3000 - 2500 cm^{-1}	Fuerte, muy ancha
	Zona 3: 2300 - 2000 cm^{-1}	
Alquino $\text{C}\equiv\text{C}$	2260 - 2000 cm^{-1}	Fina y variable
Nitrilo $\text{C}\equiv\text{N}$	2260 - 2220 cm^{-1}	Fina y variable
	Zona 4: 1850-1650 cm^{-1}	
Cetone C=O	1750 - 1705 cm^{-1}	Fuerte
Ester C=O	1750 - 1735 cm^{-1}	Fuerte
Aldehido C=O	1740 - 1720 cm^{-1}	Fuerte
Acido carboxílico C=O	1725 - 1700 cm^{-1}	Fuerte
Amida C=O	1690 - 1650 cm^{-1}	Fuerte
	Zona 5: 1680 - 1450 cm^{-1}	
Alqueno C=C	1680 - 1620 cm^{-1}	Variable
Benceno C=C	1600 y 1500-1450 cm^{-1}	Variable; 1600 cm^{-1} dos picos
	Zona 6: 1300-700 cm^{-1}	

equipo FTIR consta de dos partes. Una parte de operación mecánica codifica (modula) la información espectral empleando un interferómetro de Michelson; y la otra parte (operación matemática), procede al procesado de la información codificada para producir el espectro (descodificación).

Los componentes instrumentales básicos de un espectrofotómetro FTIR se muestra en la Figura 4.1.

Cómo puede verse en la Figura 4.1 el interferómetro de Michelson está constituido de dos espejos perpendiculares, uno fijo y otro móvil, sobre los que un divisor de luz (*beam-splitter*), hace llegar radiación procedente de la fuente. El divisor de rayos, elemento clave tiene una cara recubierta de plata, de tal modo que es semi-reflectante. Así, funciona en las dos direcciones. Los dos espejos, uno móvil y el otro estacionario son de vidrio plano y recubiertos de material reflexivo. El espejo móvil se monta en un soporte lineal de tal modo que sus movimientos siguen la dirección del rayo de luz que llega a él. En la FTIR, la fuente de luz suele ser continua, pero en espectroscopia infrarroja es variable dependiendo de la aplicación que se quiere hacer. Por ejemplo puede una fuente monocromática como el láser

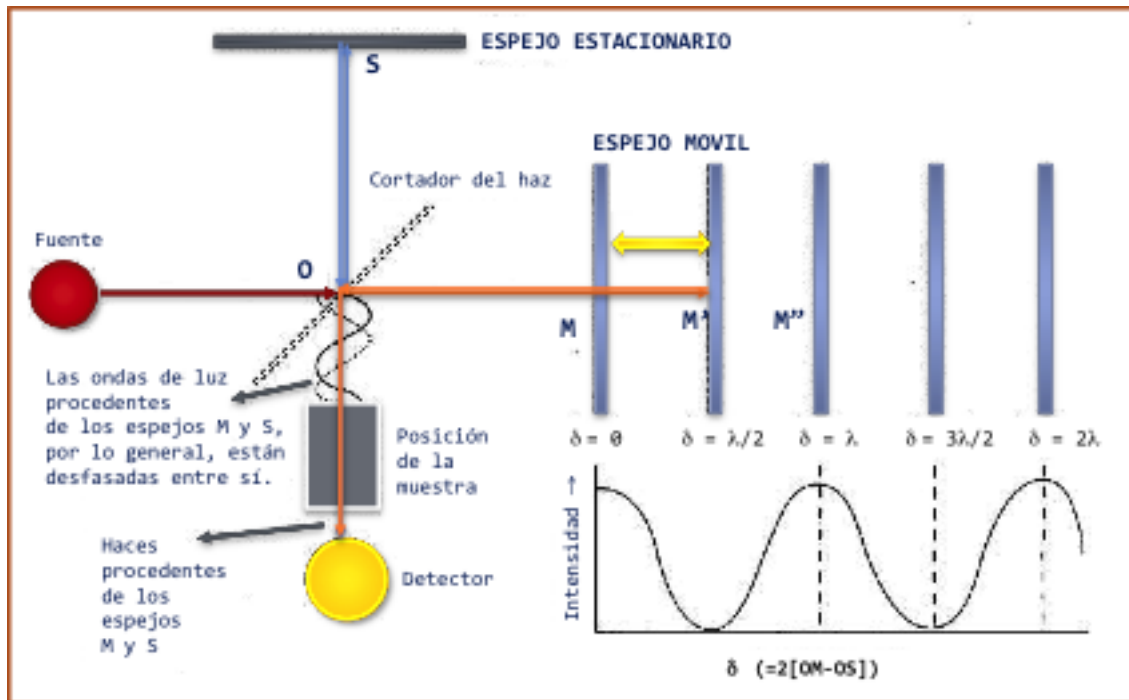


Figura 4.1: Esquema básico de los componentes de un espectrofotómetro FTIR

o una lámpara de arco de sodio [15]. Estos son válidos sobre todo para el medio infrarrojo. Para el infrarrojo lejano, puede utilizarse una lámpara de mercurio de alta presión, o bien una lámpara de tungsteno - halógeno para el infrarrojo cercano. El movimiento del espejo móvil hace que se creen patrones de interferencia constructivas o destructivas dependiendo de su posición.

Principio del interferómetro de Michelson

Cuando un rayo llega desde la fuente al divisor de rayos, este le descompone en dos rayos, uno se refleja (en el lado izquierdo del divisor que es el que está recubierto) hacia el espejo fijo y el otro le atraviesa y se dirige hacia el espejo móvil. Los dos rayos se reflejan en los espejos y vuelven al divisor de rayos y allí se dividen como precedentemente, se recombinan e interfieren. El rayo reflejado del espejo fijo al volver al divisor de rayos se descompone otra vez en dos, una parte hacia el detector y la otra hacia la fuente. El rayo reflejado del espejo móvil se refleja hacia el detector. Estos dos rayos inciden en el detector en el mismo punto. En esta zona los dos rayos interactúan y al resultado de esta interacción se le denomina *patrón de interferencia*. La interacción puede ser destructiva o constructiva debido a que el espejo fijo produce una diferencia de trayectoria entre los dos brazos del interferómetro. Si la diferencia de trayectoria es $(n + \frac{1}{2})\lambda$, la interferencia es destructiva para los rayos transmitidos (que van al detector) y constructiva para los rayos reflejados [16]. El movimiento del espejo móvil hace que los dos rayos se alternan recíprocamente en el espacio y entonces llega al detector franjas de luz y oscuridad.

Transformación de Fourier

El análisis de Fourier consiste en representar cualquier onda cómo una serie de ondas sinusoidales o viceversa, cualquier combinación de ondas sinusoidales en una serie de sinusoides de frecuencia conocida. En el detector llega una señal sinusoidal al cual puede aplicarse este principio de la transformación de Fourier. Hay dos ecuaciones que son esencial a la hora de aplicar la transformación de Fourier para relacionar la intensidad que llega al detector $I(\delta)$ a la densidad de potencia espectral a un número de onda particular $\bar{\nu}$ dado por $B(\bar{\nu})$:

$$I(\delta) = \int_0^{+\infty} B(\bar{\nu}) \cos(2\pi\bar{\nu}\delta) d\bar{\nu} \quad (4.1)$$

$$B(\bar{\nu}) = \int_{-\infty}^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\bar{\nu}\delta) d\delta \quad (4.2)$$

en donde δ es la longitud de la trayectoria.

Estas dos ecuaciones constituyen lo llamado par de la transformada de Fourier y son interconvertibles entre si. La ecuación 4.1 relaciona el patrón de interferencia, aquí la diferencia de trayectoria con la variación de densidad de potencia. La ecuación 4.2 muestra la variación de la intensidad cómo función del número de onda. Para obtener un espectro completo de FTIR, primero se produce un interferograma sin y con muestra y luego transformarlo en dos espectros correspondientes. El ratio entre ambos constituye el espectro de dispersivo de doble haz. Hoy en día, hay herramientas matemáticas muy poderosa llamada transformación de Fourier rápida (FTT, *Fast Fourier Transform*) que permiten realizar dicha transformación.

El análisis matemático por Transformada de Fourier convierte el interferograma en un espectro de frecuencias (espectro de infrarrojos) (Figura 4.2).

Entre las ventajas que ofrece la FTIR, podemos concluir que la técnica ofrece

- Rapidez: todas las frecuencias se registran simultáneamente y un espectro completo se mide en menos de un segundo.
- Sensibilidad: En el interferómetro la potencia de la radiación transmitida al detector es mucho mayor, lo que supone mayor sensibilidad (mayor relación S/N)
- Calibración interna: Los espectrofotómetros FTIR emplean un laser He-Ne como standard de calibración interna de la longitud de onda y no necesitan ser calibrados por el usuario.
- Simplicidad mecánica: el espejo móvil es la única parte con movimiento continuo del instrumento. No rendijas.

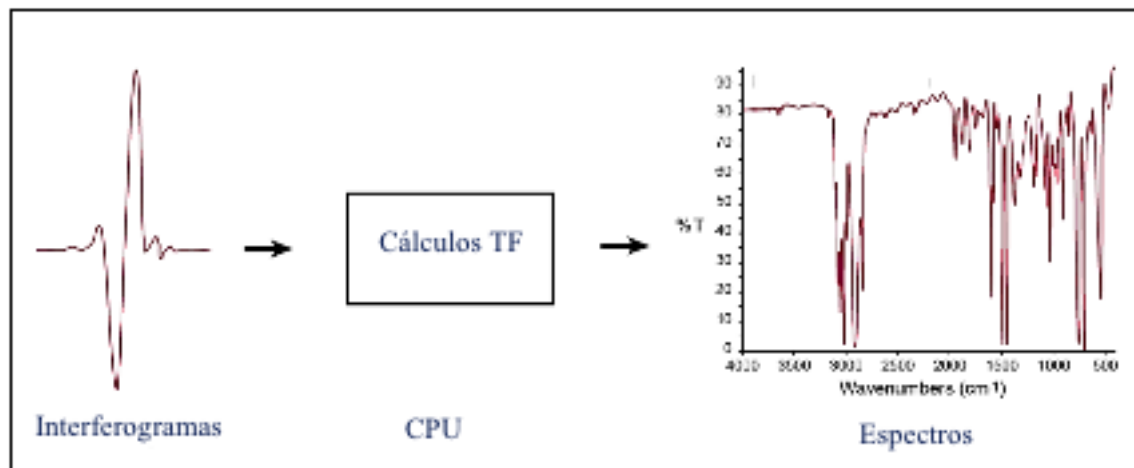


Figura 4.2: Transformación del interferograma en espectro

- Como todo el espectro IR se mide de forma continua, todos los analitos activos en IR se pueden identificar y determinar su concentración.

Parte II

Consideraciones experimentales

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales**5.1.1. Muestras**

Se utilizaron tres muestras de leche líquida y una de leche en polvo. Una de las muestras de leche fresca y la de leche en polvo provienen de la misma leche de la CAPSA (Corporación Alimentaria Peñasanta) de la Central Lechera Asturiana. Las otras muestra de leche líquida proviene de una leche comercial, una semi-desnatada y la otra desnatada. Las muestras líquidas fueron guardadas refrigeradas a 4 °C en un nevera.

5.1.2. Muestras de referencia

La muestra líquida que proviene de la Central Lechera Asturiana se utilizará como muestra de referencia y en tanto que la leche en polvo será la muestra problema, ya que el objetivo para estas dos muestras es estudiar cómo afectan los procesos de transformación en polvo a las proteínas.

5.1.3. Materiales

- Un espectrofotómetro FTIR modelo VARIAN 670-IR,
- Un espectropolarímetro de dicroísmo circular modelo JASCO J-815,
- dos (02) celdillas de 0.1 mm de paso óptico,
- Materiales de vidrio y demás utillajes de laboratorio.

Las características de estos dos espectrómetros se presentan en la tabla 5.1.

Tabla 5.1: Características de los espectrómetros utilizados

espectrómetros	CD	FTIR
Fuente de luz	Lampara de mercurio	
Longitud de onda	Región UV	Región IR mediano
Detector	Fotomultiplicador	DLaTGS

5.2. Métodos

5.2.1. Preparación de las muestras

En espectroscopia de CD, es habitual determinar la concentración a utilizar en función de la absorbancia de la muestra a una cierta longitud de onda. Esta concentración va a depender también de la longitud de la célula utilizada [17]. En nuestro caso se ensayaron una serie de diluciones la leche para trabajar al final en el intervalo entre 0.05 - 1 g/L de proteínas.

Leches líquidas

- Mediante una micropipeta, se toman 100 μL de leche fresca en un vaso de precipitados,
- Añadir sucesivamente 40 mL (probeta), 3 mL (pipeta) y 600 μL (micropipeta) de agua destilada, para obtener una concentración de 0.075 g/L de proteína.
- Agitar.

Leche en polvo

La leche líquida fresca desnatada tiene un extracto seco de alrededor del 9%. La leche en polvo lo tiene sobre el 96%, por lo tanto la forma de hacer la dilución sería diluir 1 kg de leche en polvo en 9.6 kg de agua, para obtener 10.6 kg de leche líquida¹. Por esto, en nuestro caso, reconstituimos 1 g de leche en polvo en 9.6 mL de agua destilada. Una reconstituida, el procedimiento es igual que para las leches líquidas.

5.2.2. Procedimientos

Espectrómetro de dicroísmo circular

- Abrir el flujo de nitrógeno,
- Abir el agua de refrigeración,
- Encender el espectrómetro y el termostato,
- Iniciar la aplicación *spectra manager*, y esperar 5 minutos para que el nitrógeno purgue todo el aire del equipo, y que todos los parámetros señalen OK,
- Mientras sigue el purgado, tomar 400 μL de agua destilada en una célula limpia y seca, y colocarla de tal manera que las caras no esmeriladas se espongan al rayo de luz que proviene de la fuente,
- Una vez el purgado termina, arrancar *spectrum measurment*,
- Elegir el rango de longitud de onda deseada (en este caso, *start*: 250 nm, *end*: 190 nm),
- Elegir la velocidad de barrido (en este caso 10 nm/minuto),
- Elegir el número de acumulaciones (2 en este caso),

¹Recomendación de la CAPSA, Central Lechera Asturiana, D. Enrique Alvarez Tolin

- Iniciar el análisis y guardar posteriormente los datos.

Usamos agua destilada para hacer el blanco. Después de esta primera medida, repetimos el procedimiento seleccionando el espectro del blanco como línea base. Al final de cada medida, se limpia correctamente la célula y se seca antes de la siguiente medida. El número de acumulaciones (o número de barridos) es un factor muy importante, porque cuanto más elevado es, mejor es la relación señal/ruido. No obstante, a veces lo que limita la selección de este número y de la velocidad de barrido es la estabilidad de la muestra y la del equipo. De echo, según Sharon y al. (2005) [18], no existe recomendaciones estándares acerca de los parámetros del aparato que pueden utilizarse en cualquier momento.

Para las medidas a distintas temperaturas, al final de cada espectro, se incrementa la temperatura del termostato de 10 grados centígrados, y se lanza la siguiente medida.

Espectrómetro FTIR

Las muestras líquidas se miden situando una gota sobre el diamante del ATR y evaporándola bajo corriente de nitrógeno. Cuando la muestra está seca (no se observan las bandas del agua en el espectro IR), se registra el espectro.

El principio de evaporación de la gota se fundamenta en el equilibrio líquido - vapor. La gota líquida está en equilibrio dinámico con su fase vapor. La evaporación consiste entonces en arrastrar mediante un flujo muy débil de nitrógeno, la fase vapor encima de la fase líquida. De echo, se evapora más agua para establecer un nuevo equilibrio que se arrastra y así hasta que la gota queda seca.

Una de las limitaciones del uso del FTIR, asociado con su gran sensibilidad, es la interferencia del agua, que absorbe fuertemente alrededor de 1640 cm^{-1} . De echo, es muy importante de proceder a la evaporación correcta de la muestra, y sustraer el fondo de la banda de agua. Esta ancha banda del agua es debido a dos bandas resultan de dos vibraciones de la molécula. Una vibración resulta del estiramiento del enlace O-H a 3400 cm^{-1} , una a 2125 cm^{-1} resulta de la flexión de los enlaces H-O-H. Por ejemplo, la banda de absorción amida I de las proteínas está entre 1600 cm^{-1} y 1700 cm^{-1} . Este rango recubre enteramente la banda de vibración de la molécula de agua a 1645 cm^{-1} . Además, a este número de onda, la intensidad de absorción del agua es de una magnitud superior a la absorbancia de la banda amida I [19, 10, 17].

El procedimiento es el siguiente:

- Encender el espectrómetro,
- Arrancar *Varian Resolutions Pro*,
- Tomar una medida del blanco al aire, pulsando *Background*,
- Mediante una pipeta Pasteur, depositar una pequeña gota sobre el cristal del espacio reservado a este efecto de tal modo que cubre toda la zona de medida del ATR,

- Evaporar la gota según el procedimiento descrito arriba,
- Evaporar la gota según el procedimiento descrito arriba,
- Pulsar *scan* para lanzar el análisis.
- Para la leche en polvo, depositar una pequeña muestra de polvo y presionar con el yunque para asegurarse que haya un contacto íntimo entre el polvo y el cristal de diamante. El procedimiento a continuación es el mismo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estabilidad de la estructura nativa de las proteínas es la diferencia de energía libre entre el estado nativo y el desnaturalizado o desplegado de la molécula proteica [10, 12, 17]. Las proteínas son moléculas flexibles, lo que suele implicar que la ruptura de unos pocos enlaces no covalentes sean suficientes para desestabilizar la estructura nativa. Se conoce cómo desnaturalización de una proteína a cualquiera modificación de su conformación nativa ya sea cuaternaria, terciaria, o secundaria, aunque no implique necesariamente la ruptura de un enlace proteico. En general, los procesos de desnaturalización de las proteínas en la industria alimentaria son *irreversibles*.

6.1. Resultados

6.1.1. Proceso de conversión en polvo

Espectros de dicroísmo circular

Los resultados del dicroísmo circular obtenidos para la leche fresca y su producto en polvo se presentan en la Figura 6.1.

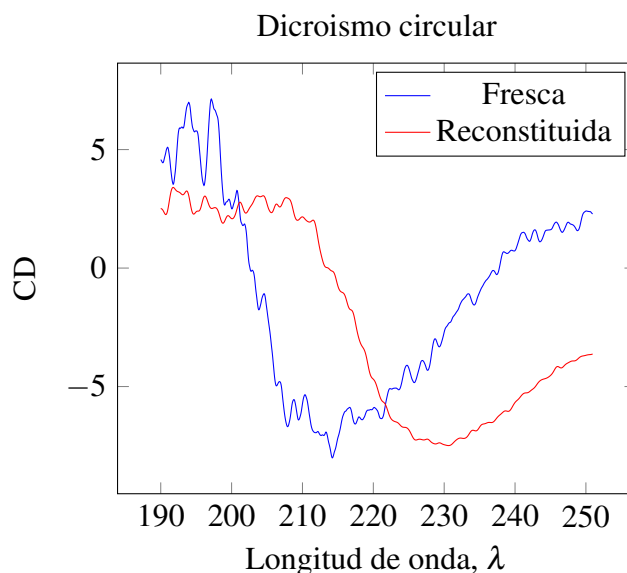


Figura 6.1: Espectro de CD de la leche fresca y en polvo

Cómo puede verse en la Figura 6.1, el espectro presenta una banda negativa alrededor de 216 nm, y una banda positiva alrededor de 195 nm. Estas bandas son características del

espectro de una estructura con predominio de la hoja- β (ver sección 3.3.2, Figura 3.10). Sin embargo, presenta una banda positiva alrededor de 200 nm, característica de los giros- β (Figura 3.10) [12]. También, presenta dos bandas negativas, una alrededor de 208 nm, y otra alrededor de 222 nm, bandas características de la hélice- α (ver Figura 3.10).

En la Figura 6.1, también se ve el espectro obtenido para la leche en polvo. cómo puede apreciarse, las bandas características mencionadas arriba alrededor de 216, 195, 222 y 208 nm han desaparecido. Sin embargo el espectro presenta una fuerte y ancha banda negativa alrededor de 230 nm. Cómo ya se vio en la sección 3.3.2, de los diferentes cambios estructurales de las proteínas, la desorganización irregular presenta una banda (débil) negativa a 235 nm. No obstante, hay que tener en cuenta que el espectro se considera cómo una suma lineal de participación de cada cambio estructural en la proteína. De hecho, se ve claramente aquí que, en global, la estructura de las proteínas en la leche en polvo es muy desordenada. El ancho de la banda puede interpretarse mediante el hecho de que los enlaces péptidicos están muy poco afectados en el proceso [17].

Espectros de FTIR

Los resultados obtenidos mediante la FTIR concuerdan con los obtenidos por el CD. En la Figura 6.2, se presenta los resultados del FTIR.

Cómo en el dicroísmo circular, el espectro FTIR de una proteína se considera cómo una suma lineal de los espectros de sus cambios conformacionales. Existen numerosas correlaciones muy bien establecidas entre los espectros infrarrojos para estructuras particulares de proteínas [20]. La estructura de las proteínas se caracteriza por nueve (09) bandas de absorción en el infrarrojo [20, 21]. Estas bandas se llaman *amida* A y B, y I a VII. Las bandas amida I y II se consideran las más importantes bandas de la vibración del esqueleto de las proteínas, siendo la banda amida I ($\bar{\nu}$ entre 1700 - 1600 cm^{-1}) la más sensible. Se la asocia a la vibración de estiramiento del grupo C=O del enlace peptídico. En cuanto a la banda amida II, está asociada a la vibración en el plano del grupo NH (flexión) principalmente y del grupo CN (estiramiento). Las otras bandas de vibración son muy complejas y dependen de varios factores cómo las cadenas laterales, los enlaces de hidrógenos etc.

Las hélices- α se asocian con bandas de absorción entre 1654 y 1658 cm^{-1} , mientras que entre 1642 y 1624 cm^{-1} , se considera que la banda de absorción es debida a las hojas- β . A los giros β , se les asocian bandas de absorción ubicadas a 1668, 1680, 1672 y 1666 cm^{-1} . Por fin, entre 1646 y 1650 cm^{-1} , las bandas de absorción se asignan a las estructuras al azar. Sin embargo, hay que destacar que existen bandas minoritarias que pueden interferir, y que son debidas, por ejemplo, a los giros- β en ciertas estructuras helicoidales, algunos aminoácidos de las cadenas laterales, los ruidos, etc. [16, 20].

En la tabla 6.1, se presenta las características de las bandas del enlace peptídico.

Como puede verse en la Figura 6.2, existe una banda intensa entre 1500 y 1700 cm^{-1}

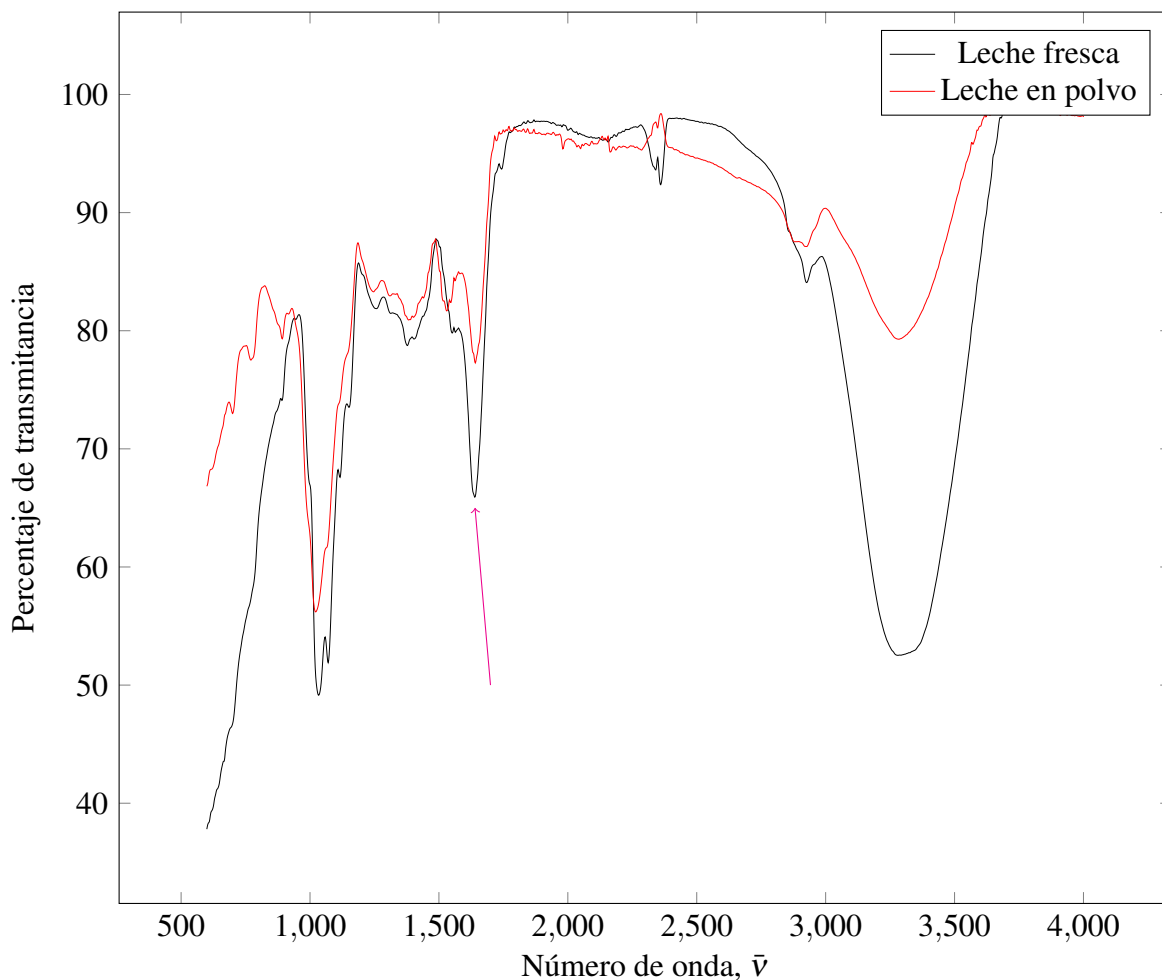


Figura 6.2: Espectro de FTIR de la leche fresca y en polvo

Tabla 6.1: Características de las bandas del enlace peptídico

Banda amida	número de onda	Vibración
A	3300	NH (estiramiento)
B	3100	NH (estiramiento)
I	1600 - 1690	C=O (flexión)
II	1480 - 1575	CN, NH (flexión)
III	1229 - 1301	CN, NH (flexión)
IV	625 - 767	OCN (flexión)
V	640 - 800	NH (flexión plana)
VI	537 - 606	CO (flexión plana)
VII	200	Torsión del esqueleto

que se corresponde con la banda amida I de las proteínas, según lo expuesto. Esta banda es claramente menos intensa en el caso de la leche en polvo, lo que parece confirmar el hecho de que las proteínas sufren una desnaturalización parcial durante el proceso de conversión en polvo, como ya se había observado en los espectros de dicroísmo.

6.1.2. Proceso de desnatado/semidesnatado

En la Figura 6.3 se presenta los espectros obtenidos a temperatura ambiente de las leches comerciales, desnatada y semi-desnatada. Se ha representado en el mismo gráfico el espectro de DC para la leche fresca. Como puede apreciarse dicha figura, por una parte, la diferencia entre el espectro de la leche fresca y los espectros de la leche desnatada y semi-desnatada corresponde a los resultados obtenidos en el caso del proceso de transformación en polvo. Esto se debe a que ambas leches, desnatada y semi-desnatada, son leches esterilizadas. Han sufrido un tratamiento térmico muy alto durante unos pocos segundos (145 °C, 3 s por ejemplo), siendo esto dependiente del binomio temperatura - tiempo de cada fábrica. Por otra parte, el espectro de la leche desnatada presenta las mismas características que el espectro obtenido en la Figura 6.1 para la leche en polvo, lo que parece indicar una desnaturalización parcial de las proteínas. Sin embargo, el espectro obtenido a partir de la leche semi-desnatada presenta alrededor de 230 nm una banda ancha y con una señal mucho más débil que en el caso de la leche desnatada. La similitud entre el espectro de la leche desnatada y el de la leche en polvo puede explicarse considerando que es una leche que ha sufrido los tratamientos de pasteurización y de esterilización. En cuanto a la leche semi-desnatada, el espectro puede explicarse por las interacciones entre los glóbulos grasos y las proteínas de la leche. Esto implicaría que la materia grasa juega un cierto papel en el estado de agregación de las proteínas.

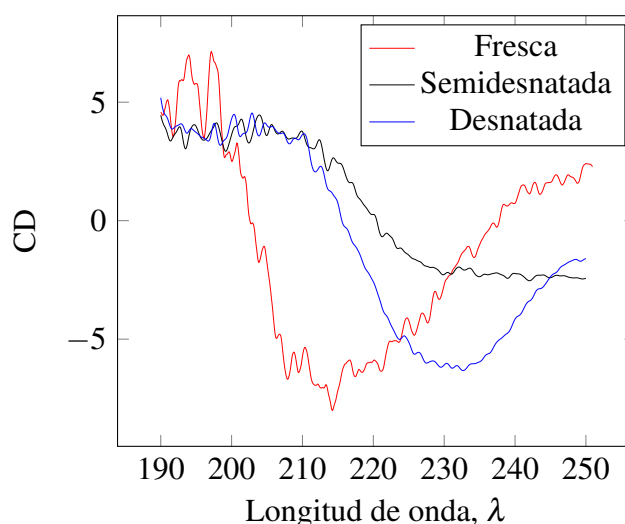


Figura 6.3: Espectros de CD de leches semidesnatada y desnatadas comerciales a temperatura ambiente

Es decir que la materia grasa podría intervenir en la estabilización de las proteínas de la leche. Sin embargo, hay que mencionar los procesos de homogeneización (por ejemplo a altas presiones) que posiblemente podrían afectar a las estructuras tridimensionales de las macromoléculas de la leche.

6.1.3. Estabilidad térmica de las proteínas de la leche

Dado que los tratamientos térmicos parecen ser los responsables de la desnaturalización parcial de las proteínas en la leche desnatada y semidesnatada, se llevó a cabo un estudio empleando espectroscopía de dicroísmo circular con las leches medidas a distintas temperaturas. Se seleccionaron temperaturas entre los 26 °C y 86 °C con intervalos de 10 °C. Los resultados para la leche semi-desnatada se presentan en la Figura 6.4.

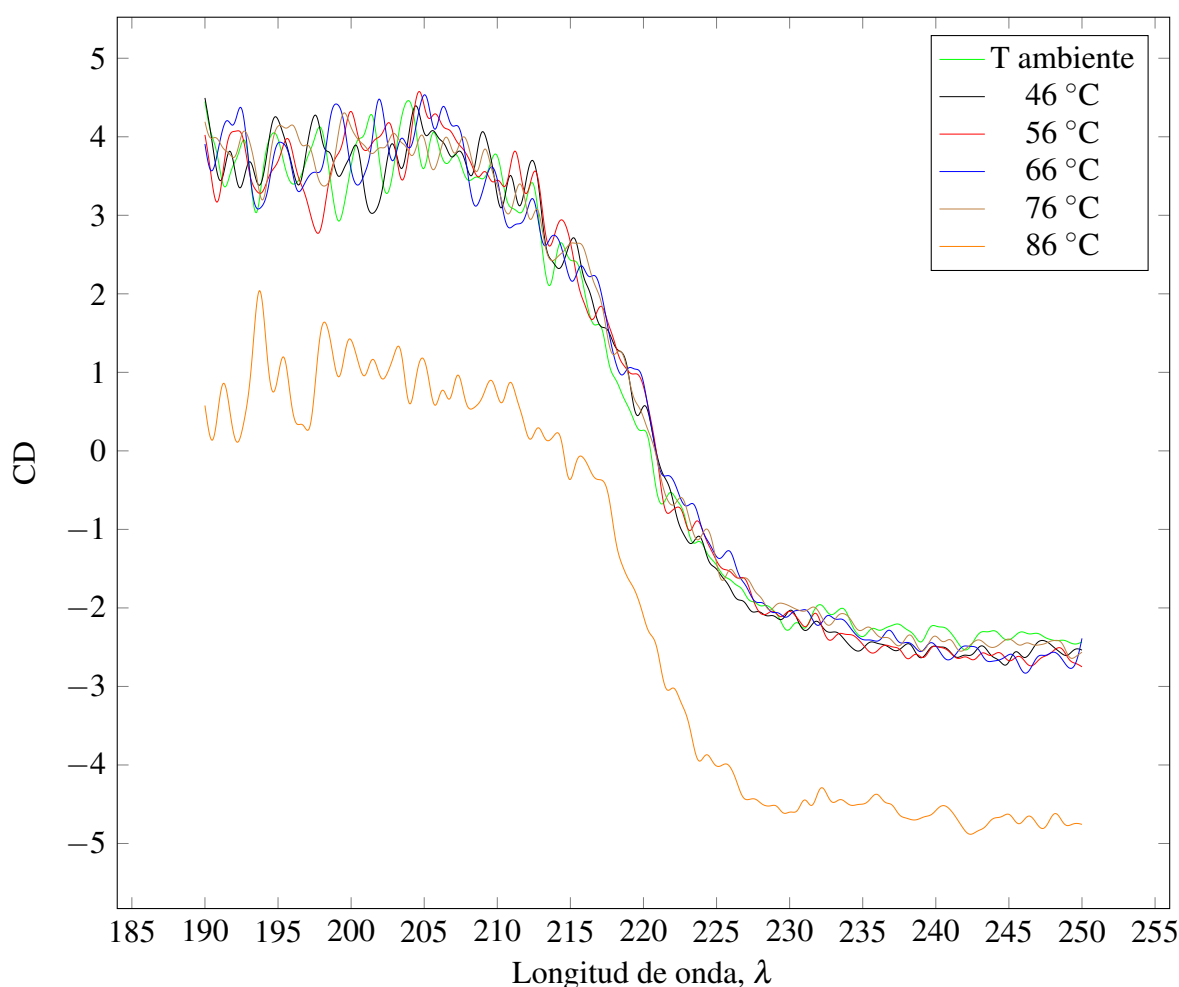


Figura 6.4: Espectros de CD de las proteínas de la leche semidesnatada a distintas temperaturas

Cómo puede apreciarse en la Figura, desde la temperatura ambiente hasta los 76 °C, la diferencia entre los espectros es poco significativa, manifestándose una clara diferencia a 86 °C. No está claro, sin embargo, que esta diferencia espectral se deba a una desnaturalización

de las proteínas, sino que más parece un desplazamiento de la línea de base del espectro, que puede ponerse de manifiesto si la muestra aumenta su turbidez.

La Figura 6.5 presenta los espectros de proteínas obtenidos para la leche desnatada. cómo se ve en la figura, existe una diferencia neta entre los espectros a las distintas temperaturas. Las proteínas en esta leche son más sensibles al efecto de la temperatura, probablemente como consecuencia de la ausencia de la materia grasa que contribuya a la estabilización de la estructura secundaria de las proteínas.

La Figura 6.6 presenta la señal de dicroísmo circular a 230 nm (longitud de onda que presenta en nuestro caso mayor sensibilidad a la temperatura) frente a la temperatura.

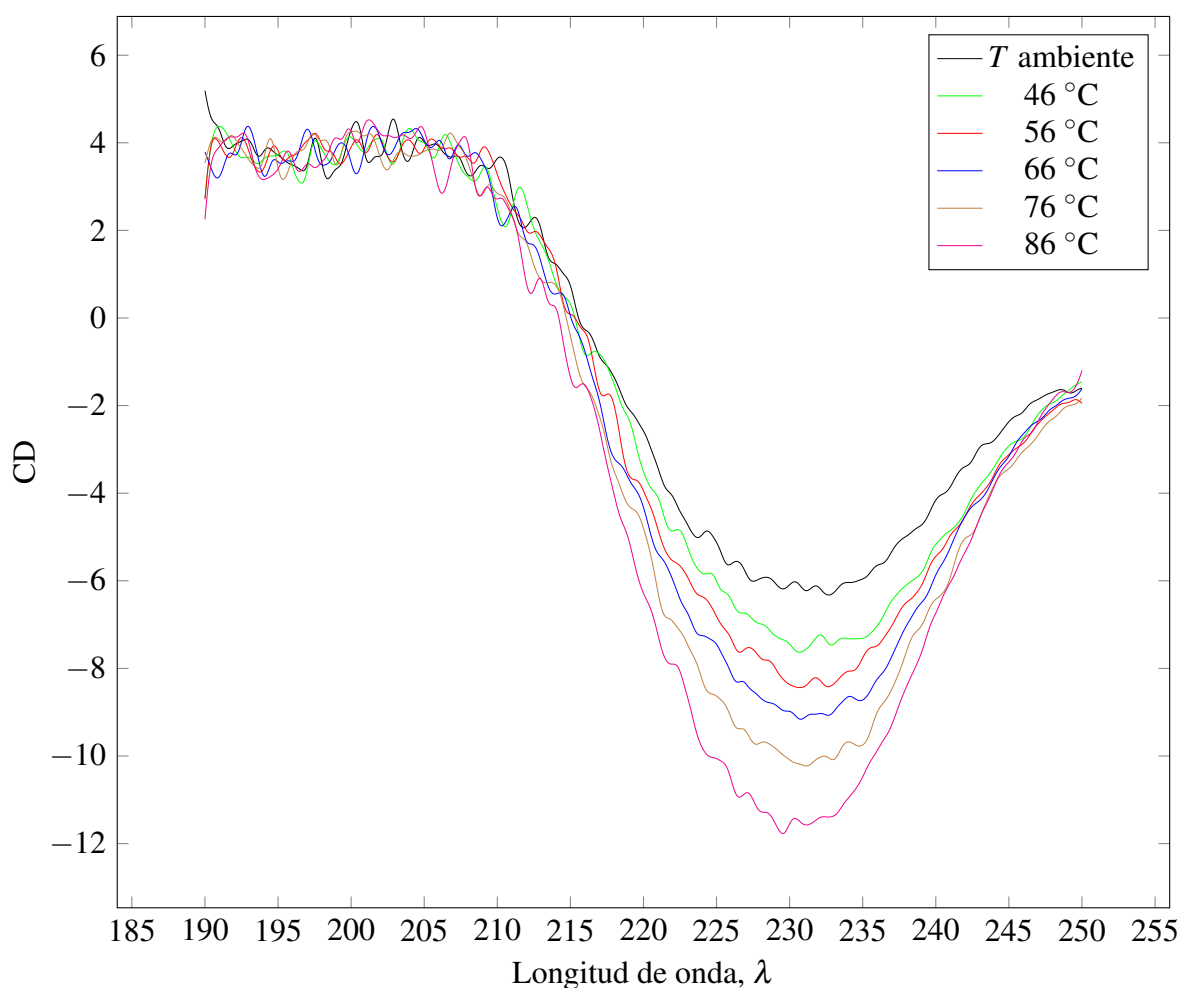


Figura 6.5: Espectros de CD de las proteínas de leche desnatada a distintas temperaturas

En la Figura se ve que en el caso de la leche semidesnatada, la señal es más o menos constante des 26 °C hasta 76 °C. A partir de esta temperatura, la señal cambia muy rápidamente y sigue bajando así. Por otro lado, para la leche desnatada, la señal disminuye linealmente en función de la temperatura.

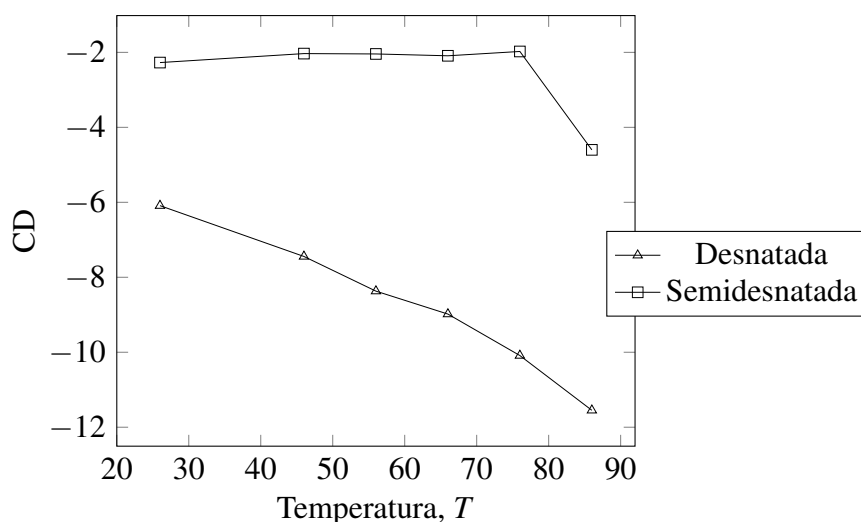


Figura 6.6: Variación de la señal de CD en función de la temperatura

6.2. Discusión

Los espectros de FTIR y de dicroísmo circular obtenidos para las proteínas aunque distintos, de acuerdo con la región o el grupo de átomo considerado, tienen mucho en común y han contribuido considerablemente a la determinación del estado de las proteínas en la leche. Cuando se usan las dos técnicas, los resultados tras la superposición y análisis son mucho mejores que cuando se usa una de ellas. Esto es, las dos técnicas son muy complementarias. El dicroísmo circular es un excelente método de determinación rápida de la estructura secundaria de las proteínas y también de sus conformaciones. Sin embargo, su principal limitación reside en el hecho de que, en general, necesita purificar las soluciones a analizar, sino el ratio señal/ruido es muy elevado. En estas circunstancias, obtener un espectro claro se dificulta mucho. La transformada de Fourier ha mejorado mucho la espectroscopia infrarroja en cuanto a su uso para el análisis de los péptidos y las proteínas. En ella, a las α -hélices, se les asocian dos bandas, una a 1655 cm^{-1} y otra a 1545 cm^{-1} , mientras las hojas- β son características de las bandas a 1630 y 1530 cm^{-1} . Además, muchas correlaciones se han encontrado entre las hélices- α y las hojas- β a ciertos números de onda [20, 21] como los mencionados arriba. De allí, mediante ecuaciones que correlacionan la intensidad de la luz absorbida a distintas longitudes de onda, con la fracción de motivos estructurales, puede estimarse la estructura secundaria de las proteínas. Sin embargo, hay que señalar que la banda amida depende fuertemente de las condiciones experimentales y sobre todo del solvente.

El uso del CD a distintas temperaturas nos permite obtener información acerca de la estabilidad de las proteínas. Con la introducción de dispositivo de calentamiento directo de la célula, es una técnica muy fácil en comparación con otras [18]. Sin embargo, existe ciertos riesgos de que la célula no transmita exactamente la temperatura entrada a la muestra.

Finalmente, hay que hacer notar que existen otras técnicas de determinación de estructu-

ras de la moléculas cómo son la resonancia magnética nuclear del protón, la espectroscopia de rayos X, etc. Estas técnicas resultan muy útiles en diversos campos como, por ejemplo, en química orgánica.

6.3. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudios muestran que los tratamientos térmicos, ya sean solo debidos a los procesos de transformación de la leche en polvo, o a los procesos de esterilización y/o pasterización, afectan notablemente a la estructura de las proteínas. También, un calentamiento, con objetivos experimentales, a distintas temperaturas llevan a las mismas conclusiones [22]. Por otra parte, para una leche semi desnatada, se ha comprobado que el efecto del calor no es una función lineal de la temperatura. De la temperatura ambiente a aproximadamente 76 °C, las proteínas guardan más o menos su estructura tridimensional intacta. Pero a partir de esta temperatura, la desnaturalización ocurre de manera muy rápida. Sin embargo, para una leche desnatada, se ha comprobado que las proteínas quedan muy sensibles al calor, de tal modo que, a 10 °C por encima de la temperatura ambiente, la desnaturalización ya empieza, siguiendo así hasta los 76 °C de manera casi lineal. No obstante, se vio que a partir de esta temperatura, la desnaturalización es más rápida que a temperaturas inferiores. Estos resultados se han obtenido mediante el uso simultáneo de la espectroscopia de dicroísmo circular en la región ultravioleta lejano, y la espectroscopia infrarroja con la transformada de Fourier. Esta última técnica es emergente, y la aplicación de la transformada de Fourier, mediante computadoras, permite transformar muy fácilmente una señal analógica en un interferograma y vice - versa. Trabaja en la región del infrarrojo medio, y se aplica a una amplia gama de moléculas. El dicroísmo circular conoce también avances importantes de modo que se uso se hace día en día más fácil y más fiable [23]. Entre estos avances puede mencionarse cómo ejemplo la disponibilidad de un amplio rango de algoritmos empíricos para los cálculos relativos a la estructura secundaria, la disposición de base de datos de referencias, etc.

NOMENCLATURA

$[\theta]$	Elipicidad molar
$\bar{\nu}$	número de onda
δ	Longitud de trayectoria en FTIR
ε	coeficiente de absorción (o absortividad) molar
θ	Elipsidad media en grados
A_l	Absorbancian de la luz polarizada circularmente a la izquierda
A_r	Absorbancian de la luz polarizada circularmente a la derecha
ADN o DNA	Acido desoxirribonucleico
CD	Dicroismo circular
DC	Dicroismo circular
DOR	Dispersión óptica rotatoria
FFT	Transformación de Fourier rápida
FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
MF	Microfiltración
NF	Nanofiltración
RO	ósmosis inversa, <i>Reverse ósmosis</i> en ingles
T	Temperatura
UF	Ultrafiltración
°	Grado de ángulo en radian o en grados
°C	grado centígrado

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Romero del Castillo Shelly Roser and Lagarriga Josep Mestres. *Productos lácteos. Tecnología.* POLITEXT, 2004.
- [2] M. Sc. José Mauricio Zavala Pope. Cambios organolépticos y nutricionales producidos por los tratamientos térmicos durante el procesamiento de la leche.
- [3] Vagn Westergaard. *Tecnología de la Leche en Polvo Evaporación y Secado por Atomización.* Niro A/S, Copenhagen, Dinamarca, 2004.
- [4] Edgar Spreer. *Lactología industrial.* Auflage, 2a edition, 1973.
- [5] Tamime A. Y. *Dairy Powders and Concentrated Products.* Dairy Science and Technology Consultant, Ayr, UK, wiley-blackwell edition, 2009.
- [6] AMIOT Jean. *Ciencia y tecnología de la leche.* Editorial ACRIBIA SA, Québec, Canada, 1991.
- [7] Engineering AB Equipo tecnico de Alfa Laval food. *Manual de industrias lacteas.* Calle Almansa, 94. 28040 Madrid.
- [8] Walstra Pieter, Wouters Jan T. M., and Geurts Tom J. *Dairy Science and Technology.* CRC Press, Boca Raton London New York, second edition, 2006.
- [9] Igor N. Serdyuk, Nathan R. Zaccai, and Joseph Zaccai. *Methods in molecular biophysics: structure, dynamics, function.* 2007.
- [10] Applequist Jon, Bode Kimberly A., Appella Daniel H., Christianson Laurie A., and Gellman Samuel H. Theoretical and experimental circular dichroic spectra of the novel helical foldamer poly[(1r,2r)-trans-2-aminocyclopentanecarboxylic acid]. *American Chemical Society*, 120(19), 1998.
- [11] Skoog Douglas A. and James J. Leary. *Analisis instrumental.* McGraw-Hill, 4 edition.
- [12] Rodger Alison and Bengt Nordén. *Circular Dichroism and Linear Dichroism.* Oxford University Press, 1997.
- [13] Reginal H. Garrett and Charles M. Grisham. *Biochemistry.* Saunders college publishing, 2nd edition, 2000.
- [14] Franck A. Settle. *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry.* Prentice Hall PTR, 1997.
- [15] Skoog Douglas A., Donald M. West, F. James Holler, and Stanley R. Crouch. *Fundamentos de química analítica.* Thomoson Learning, 2005.

- [16] Barbara Stuart. *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Wiley.
- [17] Sharon M. Kelly and Nicholas C. Price. The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current Protein and Peptide Science*, (1):349 – 384, 2000.
- [18] Nicholas C. Price Sharon M. Kelly, Thomas J. Jess. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, (1751):119–139, 2005.
- [19] Berova Nina, NAKANASHI KOJI, and WOODY ROBERT W. *Circular dichroism. Principles and applications*. John Wiley sons, 2 edition, 2000.
- [20] Jilie KONG and Shaoning YU. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 8(39):549–559, 2007.
- [21] Adriana ADOCHITEI and Gabi DROCHIOIU. Rapid characterization of peptid secondary structure by ftir spectroscopy. *Revue Roumaine de Chimie*, 8(56):783–791, 2011.
- [22] H. E. Hattem, A. N. Mamal, S. S. Hanna, and A. A. Elham. A study on the effect of thermal treatment on composition and some properties of camel milk. *Slovak J. Anim. Sci.*, (3):97–102, 2011.
- [23] Lee Whitmore and B. A. Wallace. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: Methods and reference databases. *London WCIE 7HX, UK*, 2007.
- [24] H. M. Farrel Jr, E. D. Wickham, J. J. Unruh, P. X. Qi, and P. D. Hoagland. Secondary structural studies of bovine caseins: temperature dependence of β -casein structure as analyzed by circular dichroism and ftir spectroscopy and correlation with micellization. *Food hydrocoloids*, (15):341–354, 2001.
- [25] Elena Feduchi Canosa, Isabel Blasco Castiñeyra, Carlos Santiago Romero Magdalena, and Esther Yáñez Conde. *Bioquímica: Conceptos esenciales*. Editorial medica panamericana.
- [26] Jeremy M. Berg, John L. Tymoczko, and Lubert Stryer. *Biochemistry*. W. H. Freeman and company, fifth edition.
- [27] JR. JAMES D. INGLE and STANLEY R. CROUCH. *Spectrochemical analysis*. Prentice-Hall, Inc., 1988.
- [28] Daniel C. Harris. *Análisis químico cuantitativo*. Grupo editorial Iberoamerica.
- [29] Jr Andrew Streitweiser and Clayton H. Heathcock. *Química orgánica*. McGraw-Hill, tercera edición, 1986.
- [30] Gary D.Christian. *Química analítica*. McGraw-Hill, sexta edición, 2009.

- [31] X. Fuentes Arderiu, J. Castiñeiras Lacambra, and J. M. Queralto Compañó. *Bioquímica clínica y patología molecular*, volume 1. Constitución 19, interior (Can Batllo), 08014 Barcelona, 2a edition, 1998.
- [32] Gilbert H. Ayres. *Análisis químico cuantitativo*. Harper and Row Publishers Inc, 10 East 53 Street, New York, NY10022.
- [33] JORGE RICKARDS CAMPBELL and RICARDO CAMERAS ROSS. *Las radiaciones II. El manejo de las radiaciones nucleares*. FONDO DE CULTURA ECONÓMICA, Carretera Picacho-Ajusco 227; 14200 México, D.F. Mexico, 1a edition, 1991.
- [34] 2014.
- [35] Harjinder Singh. Interactions of milk proteins during the manufacture of milk powders. *EDP sciences*, 87(2007014):413 – 423, 2007.

Apéndice

APÉNDICE A

LOS AMINOÁCIDOS NATURALES

AMINOÁCIDOS APOLARES				
ALIFÁTICOS				
$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} \end{array}$ <p>Glicina Gly G</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Alanina Ala A</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Valina Val V</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Leucina Leu L</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{C} - \text{H} \\ / \quad \backslash \\ \text{H}_3\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \quad \quad \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Isoleucina Ile I</p>
AROMÁTICOS		CON AZUFRE		IMINOÁCIDOS
$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ <p>Fenilalanina Phe F</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \end{array}$ <p>Triptófano Trp W</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{S} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Metionina Met M</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{N} - \text{C} - \text{H} \\ \quad \backslash \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \end{array}$ <p>Prolina Pro P</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{SH} \end{array}$ <p>Cisteína Cys C</p>
AMINOÁCIDOS POLARES SIN CARGA				
$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$ <p>Serina Ser S</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{H} - \text{C} - \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ <p>Treonina Thr T</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} = \text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Asparagina Asn N</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} = \text{O} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Glutamina Gln Q</p>	AROMÁTICO
TIROSINA				
$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_4 \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p>Tirosina Tyr Y</p>				
AMINOÁCIDOS POLARES CON CARGA				
CARGA NEGATIVA		CARGA POSITIVA		
$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Aspartato Asp D</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{COO}^- \end{array}$ <p>Glutamato Glu E</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{N}^+\text{H}_3 \end{array}$ <p>Lisina Lys K</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{NH} \\ \\ \text{C} = \text{N}^+\text{H}_2 \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ <p>Arginina Arg R</p>	$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \\ \text{H}_3\text{N}^+ - \text{C} - \text{H} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C} = \text{NH} \\ / \quad \backslash \\ \text{C} \quad \text{CH} \\ \quad \quad \\ \text{N}^+ \quad \text{H} \end{array}$ <p>Histidina His H</p>

OTRAS ESTRUCTURA SECUNDARIAS DE LA PROTEINAS

Algunas proteínas (sobre todo de estructura terciaria globular) presentan estructuras que son combinaciones de estructuras al azar, α y β , con una disposición característica que se repite. A estos motivos estructurales se les llaman también *estructuras supersecundarias*. Entre ellos, algunos están formados por hélices α , otros por hebras β , y otros por combinaciones de las dos.

B.1. Hélice-giro-hélice

Esta formada por dos hélices α cortas, conectadas entre sí mediante un tramo sin estructura secundaria o a menudo mediante un giro β . Este tipo de estructura es característico de nucleoproteínas (que se presentan asociados con el Acido desoxirribonucleico, ADN). Ver Figura B.1.

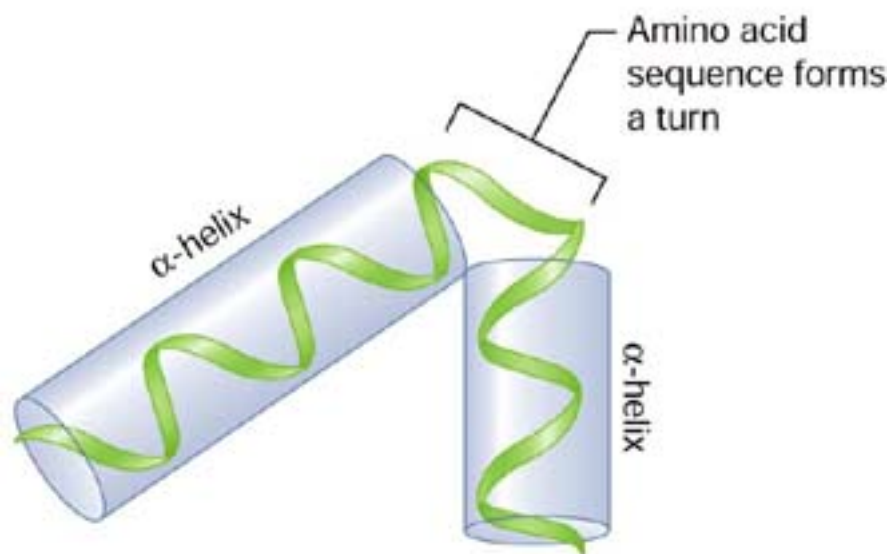


Figura B.1: Hélice-giro-hélice ^a

^aFuente: <http://carrot.mcb.uconn.edu/olgazh/bioinf2010/class12.html>

B.2. Coiled-coil

Es un motivo estructural formado por dos hélices α yuxtapuestas (Figura B.2). A veces las hélices interactúan entre sí mediante cadenas laterales de leucina, caso en el que se

llama a la estructura *cremallera de leucina* (Figura B.3. Es un motivo frecuente en proteínas que interaccionan con el DNA.

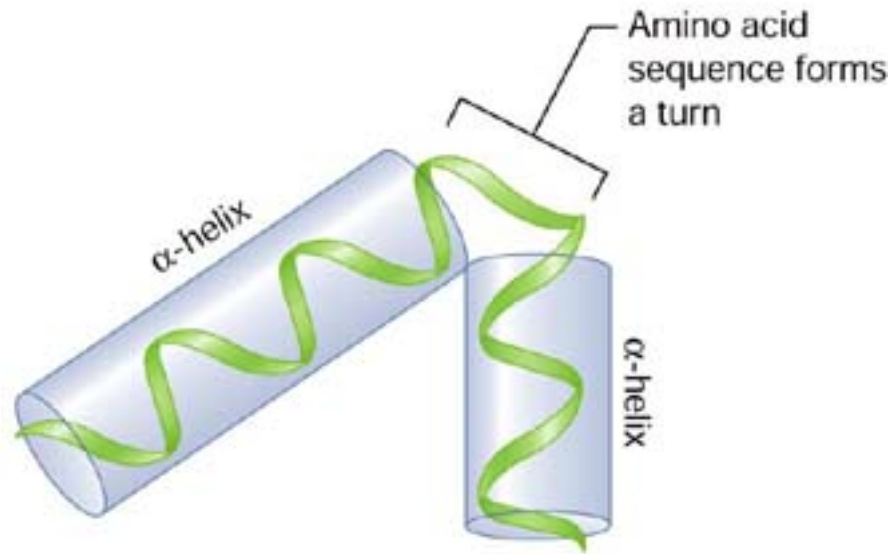


Figura B.2: Coiled coil ^a

^aFuente: http://www.syntbio.net/ka/en/KA_coiled_coil.html

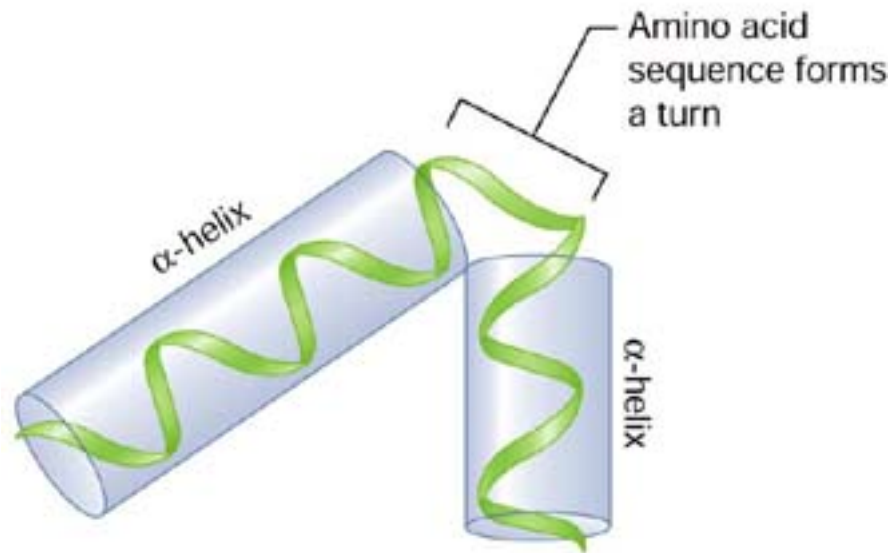


Figura B.3: Cremallera de leucina ^a

^aFuente: <http://bifi.es/~jsancho/estructuramacromoleculas/21proteinaacnucleico/21proteinaacnucleico.htm>

B.3. Horquilla β

Es un motivo estructural sencillo formado por dos estructuras β adyacentes orientando de forma antiparalela, y que se conectan por medio de un segmento con estructura al azar. Se encuentra con mucha frecuencia en las proteínas y no se le relaciona con ninguna función concreta. Entre las cadenas principales se encuentran puentes de hidrógenos representados por líneas punteadas en la Figura B.5.

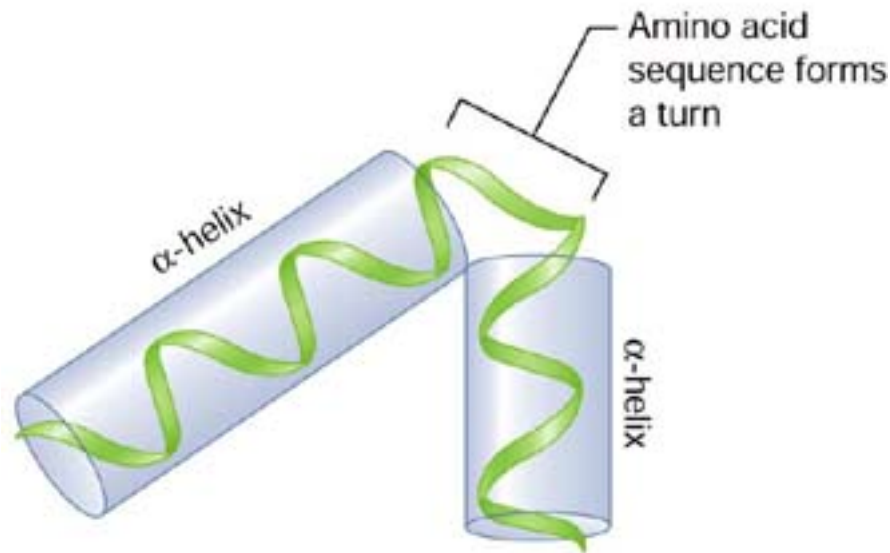


Figura B.4: Horquilla β ^a

^aFuente: <http://www2.udec.cl/~jmartine/Capitulo4.htm>

B.4. Motivo $\beta - \alpha - \beta$

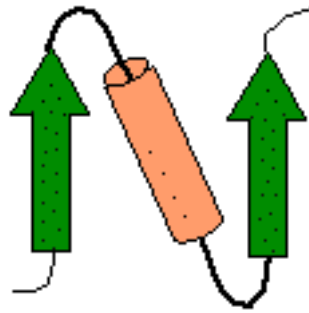
Es un motivo en el cual dos estructuras β se orientan de forma paralela mediante un segmento que contiene una hélice α y dos segmentos con estructura al azar (Figura B.4).

B.5. Meandro β

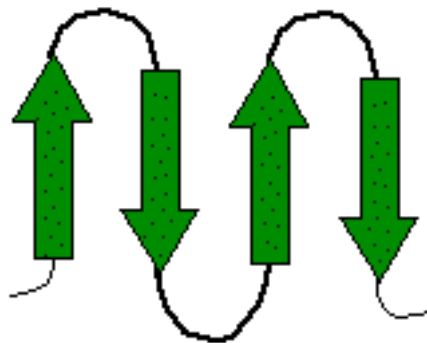
Este motivo está formado por varias hojas β antiparalelas conectadas por segmentos con conformación al azar como puede verse en la Figura B.4.

B.6. La hélice β

Es una hélice levógira formada por el enrollamiento de varias estructuras β orientadas de forma paralela. En el interior de la hélice se acumulan las cadenas laterales hidrofóbicas, lo



(a) Motivo $\beta - \alpha - \beta$



(b) Meandro β

Figura B.5: Estructuras supersecundarias ^a

^aFuente: http://www.biorom.uma.es/contenido/av_biomo/Mat3d.html

que da estabilidad a la estructura. Es un motivo estructural poco frecuente, que aparece en la proteína UDP N-Acetilglucosamina O-Aciltransferasa de *Escherichia coli*.